



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E PROPRIEDADES
FÍSICAS E QUÍMICAS DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO
SOB REFRIGERAÇÃO**

ANA CRISTINA TANELLO

**FLORIANÓPOLIS
2011**

Ana Cristina Tanello

**PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E PROPRIEDADES
FÍSICAS E QUÍMICAS DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO
SOB REFRIGERAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Renata Dias de
Mello Castanho Amboni

**Florianópolis
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

T164p Tanello, Ana Cristina
Perfil de compostos voláteis e propriedades físicas
e químicas de iogurte probiótico mantido sob refrigeração
[dissertação] / Ana Cristina Tanello ; orientadora, Renata
Dias Mello Castanho Amboni. - Florianópolis, SC, 2011.
138 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Iogurte. 3. Probióticos.
4. Compostos orgânicos voláteis. 5. Microextração em Fase
Sólida. 6. Reologia. I. Amboni, Renata Dias de Mello Castanho.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663/664

Ana Cristina Tanello

**PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E PROPRIEDADES
FÍSICAS E QUÍMICAS DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO
SOB REFRIGERAÇÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 27 de Junho de 2011.

Prof^ª. Dr.^a. Roseane Fett
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr.^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Orientadora - PGCAL/UFSC

Prof. Dr. Eduardo Carasek
PGQMC/UFSC

Prof^ª. Dr.^a. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
PGCAL/UFSC

Prof^ª. Dr.^a. Elane Schwinden Prudêncio
PGCAL/UFSC

*Aos meus pais Elizabete e Mario,
Agradeço a Deus todos os dias por fazerem parte da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para a realização deste trabalho:

À professora Dra. Renata Dias de Mello Amboni, minha orientadora, pelo acolhimento, dedicação, confiança, incentivo e pelos ensinamentos que levarei para a minha vida;

À professora Elane Schwinden Prudêncio, pela amizade, pela valiosa colaboração na execução do meu trabalho e por ser sempre tão prestativa;

Ao professor Dr. Eduardo Carasek, pela oportunidade concedida, por abrir o laboratório e mostrar-se sempre disposto a ajudar com as análises de cromatografia, além das idéias voltadas ao projeto;

Ao professor Dr. Paulo José Ogliari, pela amizade, pelos ensinamentos e ajuda com as análises estatísticas;

À doutoranda do professor Carasek, Cristine Durante de Souza, que abriu mão do seu tempo para me orientar em todas as análises de cromatografia, sendo indispensável na execução do meu trabalho, além de ter se tornado uma amizade muito sincera e querida;

Ao grupo do laboratório Leite e Derivados, Laura, André, Juliana, Carlise, Stephanie, Marina, Mariane e Rebecca, pois foram ótimos colegas de trabalho. Em especial agradeço à Isabella que nunca mediu tempo e esforços para ajudar na realização das análises;

Um agradecimento muito especial às amigas Ana Paula Prudêncio e Aureanna N. Murakami por serem mais do que colegas de trabalho, tornaram-se grandes amigas e espero do fundo do coração levá-las para sempre comigo. Adoro vocês!

Ao laboratório Frutas e hortaliças, onde realizei algumas análises, em especial à professora Edna e aos colegas Ângela e João;

Às amigas Vivian e Priscilla por estarem junto comigo nesta caminhada desde o início da graduação, pelo apoio, ombro amigo e alegrias;

À toda minha família, em especial ao meu pai e minha mãe, indispensável em todos os momentos, pelo carinho, amor, amizade,

ensinamentos, força, conselhos e apoio durante todo o período do mestrado, obrigada por tudo, sem vocês não estaria aqui!

À FAPESC pelo apoio financeiro para a concretização desta pesquisa;

Ao programa de pós-graduação e professores, pelas aulas e oportunidade para adquirir novos conhecimentos;

À empresa Chr. Hansen;

Ao Sérgio Souza pelo apoio burocrático;

Aos demais funcionários do CAL, em especial ao Seu Bento pela simpatia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no auxílio bolsa.

TANELLO, Ana Cristina. **Perfil de compostos voláteis e propriedades físicas e químicas de iogurte probiótico mantido sob refrigeração.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físicas e químicas e o perfil de compostos voláteis de iogurte probiótico adicionado de *Bifidobacterium* BB-12 e de iogurte controle. Para tanto, os iogurtes foram analisados quanto ao teor de sólidos totais, proteína, pH, composição volátil e comportamento reológico durante armazenamento refrigerado por 28 dias. O iogurte probiótico foi analisado também quanto à viabilidade da bifidobactéria. Uma pós-acidificação e decréscimo do conteúdo de proteína foram observados em ambos os iogurtes durante o período de armazenamento. O iogurte elaborado foi considerado probiótico, pois apresentou contagens da bifidobactéria superiores a 10^6 UFC/mL durante os 28 dias de armazenamento. A metodologia de superfície de resposta (MRS) foi empregada para determinar a condição ótima de extração de compostos voláteis das amostras de iogurte através da microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Através do Delineamento Central Composto (DCC) foram avaliadas as seguintes variáveis independentes: temperatura de extração (40 a 60 °C), tempo de extração (30 a 50 minutos) e concentração de NaCl (0 a 6 g). A MRS demonstrou que a condição ótima para a extração de maiores quantidades de compostos voláteis dos iogurtes ocorreu com temperatura de extração de 50 °C e 5 g de adição de NaCl. Os compostos voláteis identificados nos iogurte controle e probiótico foram a 2-butanona, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, acetona e o ácido hexanóico, sendo caracterizados como compostos chave na identificação do aroma de um iogurte. Como o iogurte controle e probiótico mostraram o mesmo perfil de compostos voláteis, a quantificação foi realizada somente na amostra de iogurte probiótico. Durante os 28 dias de armazenamento foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona e ácido hexanóico no iogurte probiótico. A SPME acoplada à GC-MS foi considerada uma boa alternativa na extração,

identificação e quantificação de compostos voláteis de iogurtes. O comportamento reológico dos iogurtes em diferentes temperaturas foi descrito pelo modelo Lei da Potência utilizando a técnica da curva-mestre, que foi construída através do uso de uma temperatura e tensão de cisalhamento de referência, 6 °C e 2,5 (Pa), respectivamente e da determinação de um fator de deslocamento (a_T). Quanto às propriedades de fluxo o modelo lei da Potência foi considerado apropriado ($R > 0,98$). Ambos os iogurtes apresentaram características de fluido Não-Newtoniano, no entanto, o iogurte controle tendência do comportamento dilatante ($n > 1$) e o probiótico predominou do comportamento *shear thinning* ($n < 1$). A curva-mestre foi considerada útil na avaliação do comportamento reológico dos iogurtes nas diferentes faixas de temperatura, tensão e taxa de cisalhamento avaliadas.

Palavras-chave: Iogurte probiótico. Compostos voláteis. Microextração em fase sólida. Reologia. Curva-mestre.

TANELLO, Ana Cristina. **Profile of volatile compounds and chemical and physical properties of probiotic yogurt kept under refrigeration.** 2011. Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the physical and chemical properties and the profile of the volatile compounds of the probiotic yogurt added of the *Bifidobacterium* BB-12 and the control. To this end, the yogurts were analyzed for total solids, protein, pH, volatile composition and rheological behaviour during storage for 28 days. The probiotic yoghurt was also analyzed as to the viability of bifidobacteria. A post-acidification and decreased the protein content were observed in both yoghurts during storage. The yogurt elaborated was considered probiotic because showed counts of bifidobacteria above 10^6 CFU/mL during the 28 days of storage. The response surface methodology (RSM) was employed to determine the optimum condition for extraction of volatile compounds from yogurt samples by solid phase microextraction in headspace (HS-SPME) combined with gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Through the Central Composite Design (CCD) were evaluated the following independent variables: extraction temperature (40 to 60 °C), extraction time (30 to 50 minutes) and concentration of NaCl (0 to 6 g). RSM showed that the optimum condition for extraction of larger amounts of volatile compounds of yogurt occurred with extraction temperature of 50 °C and 5 g NaCl. The volatile compounds identified in the control and probiotic yogurt were 2-butanone, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, hexanoic acid and acetone, were considered as key compounds in the identification of the aroma of a yogurt. As the control and probiotic yoghurt showed the same profile of volatile compounds, quantification was performed only in the sample of probiotic yoghurt. During the 28 days of storage, significant differences ($p < 0.05$) were observed between the levels of 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona and hexanoic acid in the probiotic yoghurt. The SPME coupled with GC-MS was considered a good alternative in the extraction, identification and quantification of volatile compounds in yoghurt. The rheological behaviour of the yoghurts at different temperatures was described by Power Law model using the technique of the master curve, which was built through the use of a

temperature and shear stress of reference, 6 °C and 2.5 (Pa), respectively, and establishment of a shift factor (a_T). As for the flow properties of the Power Law model was considered appropriate ($R > 0.98$). Both yogurts were characteristic of non-Newtonian fluid, however, the control yogurt trend of dilatant behaviour ($n > 1$) and probiotic dominance of shear thinning behaviour ($n < 1$). The master curve was found useful in assessing the rheological behaviour of yogurt in the different ranges of temperature, shear stress and rate appreciated.

Key-words: Probiotic yogurt. Volatile compounds. Solid phase microextraction. Rheology. Master curve.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Dispositivo da fibra de SPME com a fibra retraída.	43
Figura 2: Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco.	44
Figura 3: Formas de extração usando fibra de SPME: (A) direta, (B) headspace, (C) protegida com membranas.....	45
Figura 4: Reogramas dos fluidos independentes do tempo.....	49
Figura 5: Reogramas para fluidos independentes do tempo.....	50

CAPÍTULO 2

Figura 1: Superfície de resposta obtida pelo Delineamento Central Composto utilizando variáveis codificadas onde a resposta foi a área total dos picos cromatográficos. Tempo de extração fixado em 45 minutos.	77
Figura 2: (A) Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> valores observados. (B) Gráfico dos resíduos <i>versus</i> valores preditos para a área total dos compostos voláteis do iogurte probiótico.....	79

CAPÍTULO 3

Figura 1. Representação gráfica das curvas de fluxo, tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de deformação para os iogurtes controle e probiótico nos dias 1 e 28 de armazenamento a $2 \pm 0,1$ °C (a), $4 \pm 0,1$ °C (b), $6 \pm 0,1$ °C (c) e $8 \pm 0,1$ °C (d).	99
Figura 2. Área de histerese dos iogurtes (Controle-C e Probiótico-P) $C 2 \pm 0,1$ °C, $P 2 \pm 0,1$ °C, $C 4 \pm 0,1$ °C, $P 4 \pm 0,1$ °C, $C 6 \pm 0,1$ °C, $P 6 \pm 0,1$ °C, $C 8 \pm 0,1$ °C e $P 8 \pm 0,1$ °C nos dias 1 e 28 de armazenamento..	101
Figura 3. Curvas-mestre a temperatura de referência de 6 °C mostrando a variação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação dividida pelo fator de deslocamento (a_7) para o iogurte controle (a) e probiótico (b) nas temperaturas de 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 °C no dia 1 de armazenamento.	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características da fase estacionária usada para técnica de SPME	46
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Delineamento Central Composto (DCC) com as variáveis independentes e seus níveis utilizados para o delineamento experimental.	71
Tabela 2. Valores de sólidos totais, proteína e pH do iogurte controle e probiótico, nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento a 5 ± 1 °C.....	74
Tabela 3. Resultados do perfil de variância dos compostos voláteis do iogurte probiótico através da análise por HS-SPME e GC-MS.....	76
Tabela 4. Concentração (mg/kg) de compostos voláteis do iogurte probiótico durante o armazenamento a 5 ± 1 °C.	80

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Parâmetros reológicos obtidos utilizando o modelo Lei da Potência($\sigma = K\gamma^n$) para o iogurte controle e probiótico nas temperaturas 2,0, 4,0, 6,0 e $8,0 \pm 0,1$ °C, nos dias 1 e 28 de armazenamento.	96
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

E_a	Energia de ativação
K_T	Fator pré-exponencial
R	Coefficiente de correlação
MRS	Metodologia de Superfície de Resposta (<i>Response Surface Methodology</i>)
HS	<i>Headspace</i>
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid phase microextraction</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>)
DCC	Delineamento Central Composto
NaCl	Cloreto de sódio
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia/g de produto
m/z	Razão massa/carga
ELL	Extração líquido-líquido
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
DVB-CAR-PDMS	Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno
HS-ID	<i>Headspace</i> -imersão direta
L	Litro (unidade)
m/v	Razão massa/volume
rpm	Rotação por minuto
ANOVA	Análise de variância
RLM	Regressão Linear Múltipla
σ	Tensão de cisalhamento
Pa	Pascal (unidade da tensão de cisalhamento)
a_T	Fator de deslocamento (<i>shift factor</i>)

γ	Taxa de deformação
K	Índice de consistência (Pa.s ["])
n	Índice de comportamento de fluxo
T	Temperatura
t	tempo
HPLC	Cromatografia líquida e alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
DVS	<i>Direct Vat Set</i>
h	hora

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
1.1 LEITE	33
1.2 IOGURTE	34
1.3 PROBIÓTICOS	37
1.4 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC).....	40
1.5 MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA PARA CROMATOGRAFIA.....	42
1.6 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	42
1.7 REOLOGIA	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
2 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO SOB REFRIGERAÇÃO	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Material	69
2.2 Padrões Cromatográficos.....	69
2.3 Elaboração dos Iogurtes.....	69
2.4 Análise Microbiológica.....	70
2.5 Análise Físico-Química.....	70
2.6 Análise de Compostos Voláteis através de GC-MS	70
2.7 Identificação dos Compostos	72
2.8 Análise Quantitativa	72

2.9 Análise Estatística.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1 Análise Microbiológica.....	73
3.2 Análise Físico-Química	74
3.3 Análise de Compostos Voláteis através de GC-MS	75
4. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
 3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE	
IOGURTES DURANTE O ARMAZENAMENTO	
UTILIZANDO CURVAS-MESTRE.....	89
RESUMO	89
ABSTRACT	90
1 INTRODUÇÃO.....	91
2 MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 Material	92
2.2 Elaboração dos Iogurtes.....	92
2.3 Análises Microbiológicas.....	93
2.4 Análises Reológicas.....	93
2.5 Análise Estatística.....	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
3.1 Análise Microbiológica.....	94
3.2 Medidas Reológicas	95
4. CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
 ANEXOS.....	113
ANEXO A – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo no <i>SIMCRO - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas</i> <i>Afins</i> , Campos do Jordão, São Paulo, Brasil, 14 a 16 de setembro de 2010	115
ANEXO B – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo no <i>XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de</i> <i>Alimentos</i> , Salvador, Bahia, Brasil, 07 a 10 de novembro de 2010.	121

ANEXO C – Artigo “Analysis of Volatile Compounds in Probiotic Yogurt during Storage through Solid-phase Microextraction Gas Chromatography” submetido à publicação no *Journal of Food Science and Technology* (ISSN: 0975-8402) .. 127

ANEXO D – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo no *IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL)*, 22 a 24 de setembro, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2010. 131

INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são definidos como alimentos que contém componentes promotores de saúde, além dos nutrientes tradicionais, entre eles estão os probióticos (HALSTED, 2003). Probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas e regulares conferem inúmeros benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Os benefícios adquiridos através da ingestão de probióticos são atribuídos a fatores como efeitos antagônicos, competitivos e imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos (ZIEMER; GIBSON, 1998; BOYLSTON et al., 2004). Neste sentido, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais comuns e são utilizados em uma grande variedade de derivados lácteos, como iogurtes, sorvetes, *frozen* e queijos (BOYLSTON et al., 2004).

A prática usual para a elaboração de iogurtes contendo bactérias probióticas é adicionar bactérias convencionais do iogurte como o *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* para reduzir o tempo de fermentação, visto que os probióticos possuem baixa atividade proteolítica e se desenvolvem lentamente no leite (SAMONA, ROBINSON, 1994; SHAH; LANKAPUTRA, 1997; DAVE; SHAH, 1998). Por outro lado, *L. bulgaricus* produz durante seu armazenamento ácido lático, gerando pós-acidificação do produto podendo alterar a viabilidade da bactéria probiótica, além do seu sabor (DAVE; SHAH, 1997).

A formação de aromas em iogurtes pode ser proveniente de metabólitos produzidos pelas próprias culturas iniciadoras (*starters*) através do catabolismo da lactose (RESA et al., 2007), ou ainda, por outros compostos denominados *off-flavors* que podem ser desenvolvidos durante o armazenamento através de reações de oxidação lipídica, reação de Maillard e degradação de aminoácidos (MORR; HÁ, 1990). Porém outros compostos também podem surgir e são responsáveis pelo desenvolvimento do sabor, aroma e odor característicos como o acetaldeído, diacetil, acetona, etanol, entre outros (AMIOT, 1991; VARNAM; SUTHERLAND, 1994; BONCZAR; WSZOLEK; SIUTA, 2002). Pesquisas realizadas em iogurtes e derivados lácteos incluem o acetaldeído, diacetil, etanol, acetona, 2-butanona, 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona como compostos chave na identificação do aroma de um iogurte (IMHOF, GLATTLI; BOSSET, 1994; OTT; FAY; CHAINTREAU, 1999).

Como os compostos voláteis dos iogurtes estão presentes na forma de traços a cromatografia gasosa (GC) entra como uma ferramenta útil para a separação e detecção de analitos (McNAIR, H. M.; MILLER, 1997). O método de microextração em fase sólida (SPME) é extremamente adequado na etapa de preparo de amostras para análise em CG, visto que não utiliza solvente, tem alto poder de concentração, é aplicável a muitos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo (PAWLISZYN, 1997). Com estas vantagens, a SPME é amplamente empregada na extração de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras biológicas, ambientais (KATAOKA LORD; PAWLISZYN, 2000) e alimentares como iogurte, queijo e leite (CONDURSO et al., 2008; VAZQUEZ-LANDAVERDE et al., 2005).

Além da análise de compostos voláteis, as propriedades de fluxo também são fundamentais para a avaliação da qualidade de iogurtes, dimensionamento de sistemas de tubulação, trocadores de calor, filtros, bombas, entre outros (VASQUES, 2003) e juntamente com o sabor irá influenciar na aceitabilidade do produto pelo consumidor (AWADHWAL; SING, 1985).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de compostos voláteis de iogurte probiótico e o comportamento reológico de iogurtes durante o armazenamento refrigerado.

Este trabalho será apresentado na forma de artigos, divididos nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Capítulo 2 – Análise de compostos voláteis por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa de iogurte probiótico mantido sob refrigeração

Capítulo 3 – Avaliação do comportamento reológico de iogurtes durante o armazenamento utilizando curvas-mestre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche: principios e aplicaciones**. Zaragoza: Acribia, p. 547, 1991.

AWADHWAL, N. K.; SINGH, C. P. A rheological model for milk products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1611-1614, 1985.

BONCZAR, G.; WSZOLEK, M.; SIUTA, A. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. **Food Chemistry**, v. 79, p. 85-91, 2002.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 375-387, 2004.

CONDURSO, C.; VERZERA, A.; ROMEO, V.; ZIINO, M.; CONTE, F. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis in dairy products volatiles for the determination of shelf-life. **International Dairy Journal**, v.18, p. 819-825, 2008.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 2804-2816, 1998.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International of Dairy Journal**, Amsterdam, v. 7, p. 31-41, 1997.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Health Nutrition and nutritional Properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Córdoba, Argentina. [Internet document] URL: http://www.who.int/foodsafety/publication/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em 24 de novembro de 2010.

HALSTED; C. D. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1001-1007, 2003.

IMHOF, R.; GLATTLI, H.; BOSSET, J. O. Volatile organic compounds produced by thermophilus and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 27, p. 442-449, 1994.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.

McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. Basic Gas Chromatography. Wiley-VHC, New York, NY, p. 11, 1997.

MORR, C. V.; HÁ, E. Y. W. Off-flavors of whey protein concentrates: a literature review. **International Dairy Journal**, v. 1, p. 1-1, 1990.

OTT, A.; GERMOND, J. E.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Aroma comparisons of traditional and mild yoghurts: Headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of α -diketones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2379-2385, 1999.

PAWLISZYN J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice; Wiley-VHC, New York, NY, p. 3, 1997.

RESA, P.; BOLUMAR, T.; ELVIRA, L.; PÉREZ, G.; ESPINOSA, F. M. de. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1083–1091, 2007.

SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt culture on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 42, n. 2, p. 58-60, 1994.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in yogurt. **International of Dairy Journal**, Amsterdam, v. 7, p. 349-356, 1997.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, p. 476, 1994.

VASQUES, C. T. **Reologia do suco de goiaba**: efeito da diluição e do tamanho de partícula. Florianópolis, 2003. 66p. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

VAZQUEZ-LANDAVARDE, P. A.; VELAZQUEZ, G.; TORRES, A.; QLAN, M. C. Quantitative determination of thermally derived off-flavor compounds in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v 88, p. 3764, 3772, 2005.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 473-479, 1998.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 LEITE

O leite é uma mistura homogênea de substâncias como lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, entre outras (ORDÓÑEZ et al., 2005). É um líquido opaco, de coloração branca ligeiramente amarelada, de sabor levemente adocicado e odor característico (NOZIÉRE et al., 2006). Segundo o Ministério da Agricultura, entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

A composição química média do leite de vaca pode apresentar variações na quantidade e qualidade de seus componentes, devido a fatores como espécie (FENNEMA, 2000), raça, alimentação do animal, idade, número de parições, tempo de lactação, variações climáticas (BEHMER, 1998), estado sanitário, individualidade (FENNEMA, 2000), entre outros.

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), a composição química do leite determina seu valor nutricional, seu sabor e aroma e apresentam em média 87 % de água, 9 % de sólidos não-gordurosos (3,35 % de proteína, 4,6 % de lactose e 0,7 % de cinzas) e 4,0% de gordura. Zanela et al. (2006) ao avaliarem a qualidade do leite em sistemas de produção da região sul do Brasil obtiveram uma composição média para sistemas especializados de 3,6 % de gordura, 3,23 % de proteína bruta e 4,49 % de lactose.

As proteínas do leite são compostas de caseínas e proteínas do soro (ORDÓÑEZ et al., 2005). As caseínas encontram-se quase totalmente agregadas em forma micelar, onde a micela é constituída pelas frações protéicas de α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseínas (94 %), além de cálcio, fosfato e pequenos tores de magnésio e citrato (WALSTRA, 1990). As proteínas do soro estão em dissolução e são representadas principalmente pela β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina (ORDÓÑEZ et al., 2005). Assim como os glóbulos de gordura, a caseína é responsável por grande parte das propriedades relativas à consistência e à cor dos produtos lácteos. Diferente das proteínas do soro, as caseínas não são facilmente desestabilizadas pelo calor, permanecendo estável durante a pasteurização. Entretanto, quando ocorrem mudanças na

acidez do leite, há rompimento de sua estrutura, o que faz com que precipite e forme coágulos (WALSTRA et al., 2001).

Representando cerca de 96 a 98 % do total de lipídios do leite, os triglicerídeos encontram-se na forma de glóbulos esféricos com diâmetro variando entre 2 e 10 μm (AMIOT, 1991; FENNEMA, 2000). Os principais ácidos graxos que compõem a gordura do leite são o oléico, palmítico, esteárico, mirístico, láurico e butírico (MADRID; CENZANO; VICENTE, 1996). A fração lipídica do leite, representada pelos triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, contém em menores teores vitaminas lipossolúveis (A, D e E) e compostos responsáveis pelas propriedades sensoriais, como aldeídos, cetonas, lactonas e pigmentos carotenóides (VARNAN; SUTHERLAND, 1994). Ambas, gordura e caseínas têm importância fundamental na produção de derivados lácteos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Os carboidratos do leite são compostos essencialmente por lactose (4,6 %), glicose (0,1 %) e galactose. Já os minerais, encontrados na maioria em forma solúvel, são representados pelo sódio, potássio, magnésio, cálcio, fosfatos, sulfatos e carbonatos e em menores teores pelo zinco, cobre, cobalto, alumínio, entre outros (SPREER, 1991; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Devido ao seu elevado teor de nutrientes, a disponibilidade de água e ao pH próximo da neutralidade, o leite constitui um substrato favorável ao desenvolvimento de microrganismos oriundos de processos fermentativos, o que é desejável para a indústria de laticínios. Em contrapartida, também favorece o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, caso não haja um conjunto de ações preventivas ao longo da cadeia produtiva (DAHMER, 2006).

1.2 IOGURTE

O iogurte, leite fermentado mais popular, é caracterizado como um gel suave, viscoso e com sabor característico (PENNA; OLIVEIRA; BARAFFALDI, 1997; LUCEY; SINGH, 1998). Dentre os fatores que justificam o grande sucesso no consumo desse produto destacam-se as características sensoriais (principalmente o gosto ácido), as propriedades naturais, saudáveis e o custo moderado (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2000; FUENTE et al., 2002). Além disso, o aumento no consumo de iogurtes pode ser atribuído também à adição de aromas e sabores de frutas, que os tornam mais saborosos e atraentes para o consumidor (RODAS et al., 2001).

Iogurte é o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*. O leite utilizado na fabricação de leites fermentados pode ser natural ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea (leite concentrado, entre outros), bem como de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2004).

A fermentação do leite através das culturas lácticas resulta em vários tipos de produtos, todos com vida de prateleira mais extensa do que o leite fresco, devido à formação de componentes metabólicos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório nas bactérias gram-negativas responsáveis pela deterioração do produto (MARTINS et al., 1988; VEDAMUTHU, 1991). Além de aumentar a vida de prateleira de leite *in natura*, o processo fermentativo torna o produto mais seguro e nutritivo. Entretanto, a cultura (*start*) do iogurte deve conter uma percentagem igual das duas bactérias, do contrário não se obterá a consistência e a característica desejável do odor no produto industrializado (BEHMER, 1991).

As bactérias fermentadoras exibem uma relação simbiótica durante o processamento do iogurte, onde a taxa de crescimento entre as espécies é alterada constantemente durante o seu processamento (RADCKE-MITCHELL; SANDINE, 1984). O *S. thermophilus* apresenta baixas atividades proteolíticas e assimilam em torno de 50-70 % dos aminoácidos livres liberados pelo *L. bulgaricus* no processo de produção ácida (BESHKOVA et al., 1998). A partir desta fermentação, um gel protéico fraco é formado devido à diminuição do pH do leite, ocasionada pela conversão de lactose em ácido láctico pela cultura de bactérias da fermentação (O'DONNELL; BUTLER, 2002).

Além de prosseguir a fermentação láctica, o *Lactobacillus* hidrolisa certas proteínas que fornecerão ao *Streptococcus* os peptídeos e os aminoácidos essenciais à continuação do seu desenvolvimento. O *Lactobacillus* é o principal produtor de compostos responsáveis pelo sabor e o aroma característico do iogurte (acetaldeído, diacetil e etc). A refrigeração do iogurte interrompe o crescimento das bactérias lácticas, que mantêm, no entanto, certa atividade metabólica (FERREIRA, 1996).

O tratamento térmico do leite, como a pasteurização, é de extrema importância na formação do gel ácido, pois as proteínas desnaturadas irão interagir com as κ -caseínas das micelas de caseína, via interações hidrofóbicas e ligações dissulfeto intermoleculares. Nesta etapa da fermentação do iogurte a atração entre caseínas aumenta com a

diminuição do pH do leite de 6,6 para 4,6, o que resulta na geleificação quando as caseínas se aproximam do seu ponto isoeletrico (pH ~ 5,0) (LEE; LUCEY, 2004). Esta estrutura de gel contribui substancialmente para todas as propriedades sensoriais de textura do iogurte (O'DONNELL; BUTLER, 2002). Além da formação do gel, podem ocorrer alterações do equilíbrio osmótico, inativação de enzimas sensíveis ao calor, escurecimento enzimático e reação de Maillard (LUCEY; SINGH, 1998).

De uma maneira geral, o iogurte contém as mesmas quantidades de nutrientes que o leite do qual ele foi processado, no entanto, alguns nutrientes apresentarão melhor digestibilidade, como proteínas e lipídios, por sofrerem hidrólise parcial durante a fermentação (ÇON, et al., 1996; FERNÁNDEZ-BAÑARES et al., 2006).

As propriedades físicas do iogurte, incluindo a separação do soro (sinereze), apresentam um papel importante na qualidade do produto e aceitação pelo consumidor. A separação do soro na superfície do produto é considerada o principal defeito na produção do iogurte (SANDOVAL-CASTILLA et al., 2004). As causas mais comuns para a ocorrência da sinereze incluem a utilização de alta temperatura de incubação, altas concentrações de proteínas do soro em relação às caseínas, baixa concentração de sólidos totais e alteração física do produto durante o armazenamento e distribuição (LUCEY, 2004). Para evitar este tipo de problema, pode-se realizar o enriquecimento do conteúdo de matéria seca e/ou do conteúdo proteico do leite antes da fermentação (LORENZEN et al., 2002).

A formação de aromas em iogurte é proveniente de metabólitos produzidos pelas culturas *starters* ou ainda do próprio catabolismo da lactose, neste último representado pelo ácido láctico (RESA et al., 2007). Porém, outros compostos também podem surgir e são responsáveis pelo desenvolvimento do sabor, aroma e odor característicos destes tipos de leites fermentados como o acetaldeído, diacetil, acetona, peptídeos, acetato, etanol, entre outros (AMIOT, 1991; VARNAM; SUTHERLAND, 1994; BONCZAR; WSZOLEK; SIUTA, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os compostos responsáveis pelo aroma final no iogurte podem ser divididos em quatro categorias, os ácidos não-voláteis (láctico ou pirúvico), ácidos voláteis (butírico ou acético), compostos carbonílicos (acetaldeído ou diacetil) e compostos diversos (aminoácidos ou produtos formados pela degradação térmica). A determinação quantitativa dos ácidos orgânicos é de extrema importância para o monitoramento do crescimento e atividade da bactéria (IZCO et al., 2002), além de serem

importantes indicadores sensoriais do produto (FERNADEZ-GARCIA; MCGREGOR, 1994).

Compostos voláteis do leite e derivados são estudados através de muitas técnicas de extração. Entretanto, a mais recente é a análise por *headspace*, utilizando a técnica de microextração por fase sólida (SPME) acoplada à análise cromatográfica. Essa técnica é amplamente utilizada para a extração de compostos voláteis de produtos lácteos como queijos, iogurtes, leite em pó, achocolatados e fórmulas infantis (OTT et al., 1999; PINHO; PERES; FERREIRA, 2003).

1.3 PROBIÓTICOS

Diversas definições sobre probióticos foram publicadas nos últimos anos, entretanto, a definição mais aceita é que são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas em humanos e animais, afetam benéficamente a saúde, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (GOMES; MALCATA, 1999; FAO, 2001; SCHREZENMEIER; DE VRESE, 2001; NOMOTO, 2005). A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a proliferação de bactérias benéficas em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/100g de produto) de microrganismos probióticos (10^6 a 10^7 UFC/g de produto) (CHARTERIS et al., 1998).

O melhor método de administração de probióticos é a ingestão contínua, garantindo a presença no intestino em grande número e produzindo os efeitos desejados (CHEN; WALKER, 2005). Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são o controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos (GUEIMONDE et al., 2006), diminuição da população de patógenos através da produção de ácido acético e lático, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002), alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, produção de vitaminas, entre outros.

A seleção de bactérias probióticas para uso em alimentos tem como base os seguintes critérios preferenciais: bactéria de origem humana, estabilidade frente a ácido e a bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino (STANTON et al., 2003). Do ponto de vista tecnológico, um microrganismo deve possibilitar a sua produção em larga escala; resistir ao processamento (FERREIRA; TESHIMA, 2000); manter a acidez estável; apresentar sabores e/ou aromas adequados, bem como textura agradável, após a fermentação; além de manter uma determinada contagem de células viáveis durante toda a vida de prateleira do produto (LEE; SALMINEN, 1995; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas são isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (BIELECKA et al., 2002). As espécies mais frequentemente empregadas na produção de derivados lácteos são *L. acidophilus*, *L. casei* (LEE; SALMINEN, 1995), *L. rhamnosus* (FERREIRA; TESHIMA, 2000), *B. bifidum*, *B. longum* (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2003), *B. animalis* subsp. *lactis* e *B. breve*, sugerindo-se ainda a utilização de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 nestes tipos de produtos (CHR HANSEN, 2004). Segundo Lee et al. (1999), as bactérias mais amplamente utilizadas pela indústria de alimentos pertencem ao grupo das bactérias lácteas, embora algumas bifidobactérias e leveduras também sejam utilizadas.

Muitos fatores podem alterar a viabilidade das bactérias probióticas no produto, dentre eles o pH baixo após a fermentação, o teor de oxigênio, a adição de substâncias durante a etapa de produção, a sensibilidade a algumas substâncias produzidas pelas bactérias do iogurte, a temperatura de estocagem, entre outros (HOLZAPFEL; SHILLINGER, 2002; DONKOR et al., 2006). Devido a sua baixa atividade proteolítica, as bactérias probióticas se desenvolvem lentamente no leite, sendo recomendada a adição de bactérias do iogurte para redução do tempo de fermentação. De acordo com Scheinbach (1998), o uso de *Streptococcus thermophilus* em produtos fermentados melhora a atividade proteolítica e favorece a condição de anaerobiose exigida pelas bifidobactérias (ARUNACHALAM, 1999), visto que o *S.*

thermophilus tem maior habilidade em utilizar o oxigênio. Por outro lado, tem-se verificado que o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, uma das bactérias geralmente empregadas na produção de leites fermentados, produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada, gerando pós-acidificação do produto, podendo afetar a viabilidade das bactérias probióticas (DAVE; SHAH, 1997). A fim de superar o problema da pós-acidificação, melhorar a atividade proteolítica e gerar a condição de anaerobiose, a atual tendência é o uso de fermentos ABT (culturas associadas ou co-culturas), que contêm *L. acidophilus*, bifidobactéria e *S. thermophilus* (ZACARCHENCO; MASSAGUER-ROIG, 2004). Oliveira et al. (2002a) afirmaram que bactérias lácticas podem ser adicionadas durante a mistura final do produto diminuindo os custos da produção de leite fermentado contendo probióticos.

Vinderola, Bailo e Reinheimer (2000) afirmaram que a adição de bactérias probióticas ao leite fermentado é prática amplamente adotada pelos laticínios. Contudo, fatores como acidez do iogurte, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem condicionar a sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados (VINDEROLA et al., 2000). Sobre condições de estocagem destes produtos, os mesmos autores (VINDEROLA, BAILO, REINHEIMER, 2000) concluíram não haver estudos suficientes sobre a sobrevivência dos probióticos durante a estocagem refrigerada.

Como as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácido acético (SAMONA; ROBINSON; MARAKIS, 1996) e láctico a taxa de 3:2, seu desenvolvimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma de “vinagre”, dificultando a aceitação do produto pelos consumidores. Assim, uma combinação de linhagens específicas deve ser determinada para evitar esse problema, selecionando-se aquelas que promovam as propriedades sensoriais e de sobrevivência mais vantajosas (MATTILA-SANDHOLM et al., 1996).

As características sensoriais desempenham papel importante na aceitação do produto pelo consumidor. Iogurte apresenta distinguível sabor influenciado por diferentes fatores, como a viscosidade e presença de compostos voláteis (OTT et al., 2000). Diversos compostos voláteis foram isolados de produto tipo iogurte, entretanto, somente acetaldeído, etanol, acetona, diacetil e 2-butanona foram encontrados em quantidades substanciais (KNEIFEL et al., 1993). Oliveira et al. (2002b) encontraram diferença na concentração de acetaldeído em iogurtes preparados com culturas puras e co-culturas de probióticos após um dia e sete dias de armazenamento a 4°C. No iogurte preparado com cultura

pura, a concentração de acetaldeído foi praticamente inexistente, enquanto foi na ordem de 10 ppm em iogurte preparado com co-cultura após um dia de armazenamento, caindo praticamente a zero após sete dias. Estes pesquisadores ainda observaram que a estabilidade do aroma foi maior quando co-culturas contendo *L. bulgaricus* foram empregadas, porém a concentração de acetaldeído presente nos iogurtes contendo bactérias probióticas foi inferior àquela fabricada somente com a cultura “clássica” do iogurte.

Em geral, produtos lácteos contendo *L. acidophilus* são caracterizados como pobres em sabor, devido ao fato de que esta bactéria apresenta uma enzima, a álcool desidrogenase, que converte acetaldeído em etanol (MARSHALL et al., 1982).

Muitas pesquisas em termos de probióticos encontram-se voltadas para leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos probióticos comercializados no mundo. Outros produtos comerciais contendo essas culturas incluem sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém nascidos, sorvetes de iogurte e diversos tipos de queijo (STANTON et al., 2003).

Em geral, poucos estudos relatam dados quantitativos dos aromas constituintes de espécies de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias. Muitos trabalhos sobre a elaboração de produtos contendo probióticos estão publicados, inclusive no desenvolvimento de bebidas lácteas e iogurtes (CUNHA et al., 2008; CASTRO et al., 2009; CUNHA et al., 2009), porém nenhum deles relata o perfil de compostos voláteis liberados por estas culturas probióticas durante sua vida de prateleira.

1.4 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

A cromatografia é um método físico-químico que tem a capacidade de separar componentes de uma amostra, realizada pela distribuição destes componentes em duas fases. Uma das fases está fixa, enquanto a outra passa através dela. A amostra é introduzida no equipamento e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma, que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (LANÇAS, 1993; COLLINS, 1998; JAMES, 1995; COLLINS 2006).

A Cromatografia Gasosa recebe este nome devido ao fato da fase móvel utilizada ser um gás (SKOOG, et al., 2002; COLLINS et al.,

2006). A amostra é introduzida na coluna através de um injetor, onde o gás de arraste irá fluir e carregá-la. Essa técnica é utilizada na separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. A volatilidade dos compostos pode ser conseguida aumentando a temperatura do local de injeção da amostra e na coluna, ou derivando-se os compostos em outros, mais termicamente estáveis e apolares (EDWARDS, 1970; COLLINS, 1988).

O componente da amostra cuja afinidade pela fase estacionária for maior demorará mais tempo para ser eluído que aquele cuja interação com a fase estacionária é menor. Conectando-se um detector à saída da coluna, constata-se a eficiência da separação através do registro de um cromatograma (LEITE, 2002). Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são: sistema de gases, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, detector e registrador (SKOOG, et al., 2002). A cromatografia acoplada à espectrometria de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade) (VÉKEY, 2001).

O espectrômetro de massas permite análises de alta especificidade em amostras complexas (SKOOG et al, 2002; COLLINS et al., 2006). Os principais componentes de um espectrômetro de massas são: bomba de vácuo, fonte de ionização, analisador de massa, sistema de detecção de íons (transdutor) e processador de sinais. Os três primeiros componentes ficam dentro do sistema de vácuo para manter a pressão baixa (SKOOG et al., 2002).

O propósito do sistema de injeção é introduzir uma micro quantidade de amostra que será transformada em vapor. Dentro da fonte de ionização, a amostra vaporizada irá colidir com íons positivos, convertendo-se em íons moleculares (devido à perda de um elétron) com a mesma massa molecular que a molécula (SKOOG et al., 2002).

Os íons formados são atraídos por uma fenda (produzindo aceleração) para dentro do analisador de massa, onde ocorre então a separação dos íons (em movimento) de acordo com a razão massa-carga (m/z), onde m é a massa do íon em unidades de massa atômica e z é a sua carga. Como a maioria dos íons formados é de carga unitária, m/z é normalmente a massa do íon. As condições entre elétrons energéticos e moléculas de analito, normalmente, fornecem energia às moléculas para deixá-las em estado excitado. O relaxamento, geralmente, ocorre por fragmentação produzindo íons positivos de massas menores (SKOOG, et al., 2002). As colisões entre as moléculas da amostra e os íons são altamente reativas. A última etapa é a de contagem do número de íons

de cada tipo ou medida da corrente iônica produzida por um transdutor adequado. O transdutor irá converter o feixe de íons formados para um sinal elétrico que pode ser processado e registrado (SKOOG, et al, 2002).

1.5 MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA PARA CROMATOGRAFIA

O preparo da amostra é uma das etapas mais críticas da análise química e consiste na extração, que visa a remoção dos analitos da matriz e o isolamento dos analitos de interesse, eliminando os interferentes (LANÇAS, 2004). O objetivo principal é transferir os analitos de interesse da matriz original para a instrumentação cromatográfica, afim de não comprometer a análise química. A maioria das técnicas de preparo de amostras são automatizadas, para possibilitar a eliminação de erro humano na manipulação, diminuir o tempo de assistência do analista durante a análise, evitar o risco de contato com substâncias prejudiciais a saúde e aumentar significativamente o número de análises de amostras por tempo (LANÇAS, 1993).

Os principais métodos de extração de amostra são a extração com fluido supercrítico, extração acelerada com solvente, extração líquido-líquido (ELL), extração com Soxhlet, *headspace* dinâmico ou *purge e trap*, extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Os processos clássicos de extração envolvem muitas etapas, utilizam solventes de alta pureza e alto custo, além de serem tóxicos e carcinogênicos. Estes fatores têm levado ao desenvolvimento de novos métodos, onde as principais vantagens são a rapidez e a ausência ou uso de pequeno volume de solventes. Como exemplo destes métodos pode-se citar a extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME) e o *purge and trap* (LANÇAS, 2004). A SPME tem sido aplicada em análises físico-químicas, ambientais (de solos e águas), alimentares (aromas e flavorizantes) e de produtos farmacêuticos (PAWLISZYN, 1999; VALENTE e AUGUSTO, 2000).

1.6 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em fase sólida teve seu primeiro conceito publicado em 1989 por BELARDI e PAWLISZYN, mas o grande

desenvolvimento da técnica ocorreu na década de 90 (BELTRAN; LÓPEZ; HERNÁNDEZ, 2000).

É uma técnica relativamente simples do ponto de vista experimental, e apresenta diversas vantagens sobre as técnicas tradicionais. O procedimento analítico, por exemplo, é mais simples e mais rápido que a ELL (Extração Líquido-Líquido), e a SPE (Extração em Fase Sólida), e em geral extratos mais limpos são obtidos (OLIVARES, 2006). A técnica de SPME integra amostragem, extração e concentração numa única etapa praticamente livre de solventes, apresenta um bom desempenho analítico, custo relativamente baixo e pouca manipulação da amostra (ARTHUR; PAWLISZYN, 1900; O'REILLY et al., 2005).

O dispositivo básico da SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 μm de diâmetro, com 1 cm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (fase extratora). Na Figura 1 pode ser observado um dispositivo da fibra de SPME. Além do dispositivo da fibra é necessário um aplicador ou *holder* (espécie de seringa) que permite o manuseio das fibras para a extração. Neste aplicador (Figura 2) a fibra é presa a um êmbolo. Na extremidade oposta ao êmbolo, o tubo hipodérmico fica exposto, pois além de proteger a fibra ele é a agulha com que é perfurado o septo do frasco da amostra e do injetor do cromatógrafo (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A extração dos analitos dá-se pela afinidade dos mesmos pelo material sorvente; a quantidade extraída das espécies de interesse é função da constante de equilíbrio entre o recobrimento e o analito. Assim, a SPME é uma técnica de equilíbrio, ou seja, em condições ideais de extração, haverá um equilíbrio entre a amostra e o filme sorvente; a partir daí, a massa de analitos extraída pela fibra não mais aumentará (ULRICH, 2000).

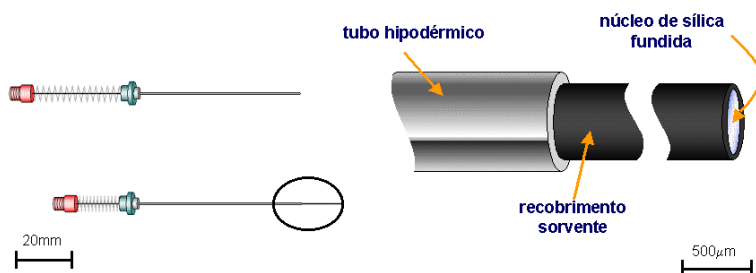


Figura 1: Dispositivo da fibra de SPME com a fibra retraída.

Fonte: Budziak (2009).

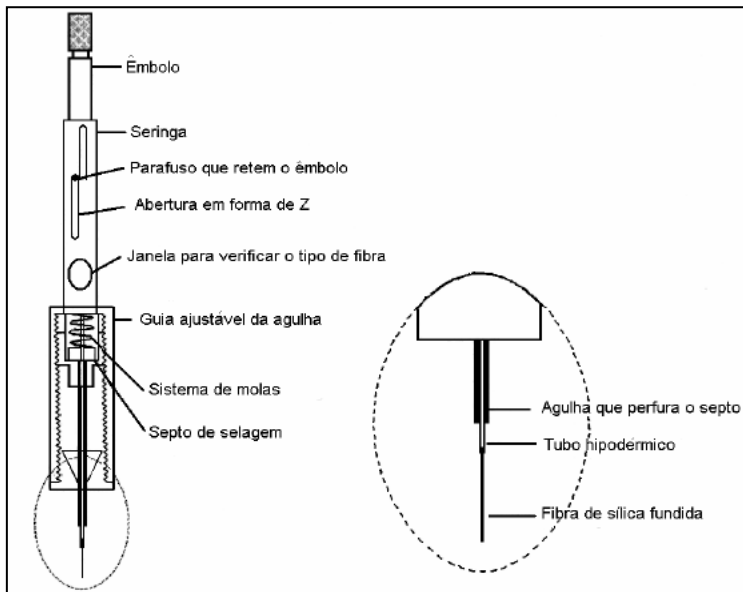


Figura 2: Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco.

Fonte: Bortoluzzi (2007).

O processo de SPME pode ser resumido em duas fases: na primeira, os analitos alvos são extraídos de uma matriz quando a fibra é exposta à amostra por um determinado tempo. Na segunda etapa, a fibra é removida da amostra e os analitos retidos são dessorvidos em um instrumento analítico para serem separados e quantificados (HERNANDO, 2002; LANÇAS, 2004).

A Figura 3 ilustra as três diferentes formas de extração do analito através do método de SPME: a direta, a *headspace* (ou espaço confinante) e a protegida com membranas. Na extração, a seção recoberta com o material sorvente (polímeros ou sólidos adsorventes) é colocada diretamente em contato com a amostra (A e C) ou com o seu espaço confinante (B), onde irá ocorrer sorção das espécies de interesse presentes na amostra. Terminando o tempo de extração a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no cromatógrafo gasoso. Com a fibra retraída o septo do injetor do GC é perfurado, a fibra é exposta para dessorção térmica e terminado esse processo é retraída e retirada do injetor (MOTLAGH; PAWLISZYN, 1993; EISERT et al., 1996; ZELDA, 1996; VALENTE; AUGUSTO, 2000).

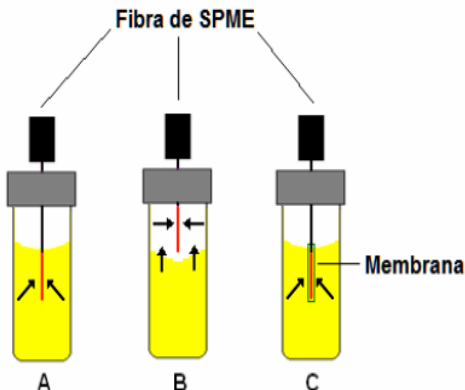


Figura 3: Formas de extração usando fibra de SPME: (A) direta, (B) headspace, (C) protegida com membranas.

Fonte: Bortoluzzi (2007).

Na extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou adsorção para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre as fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição ou adsorção do analito entre elas (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Na microextração em fase sólida não ocorre extração exaustiva, mas sim, equilíbrio entre a fase aquosa e a fase orgânica estacionária (LANÇAS, 2004).

Há vários parâmetros que devem ser otimizados e controlados para o uso de SPME, dentre eles os principais são a escolha do revestimento da fibra; temperatura e tempo de extração; pH; força iônica do meio; velocidade de agitação; tempo e temperatura de dessorção (PEÑALVER et al., 1999; SNOW, 2000; LANÇAS, 2004).

A escolha do revestimento da fibra constitui um dos aspectos críticos na otimização da SPME e permite obter uma boa seletividade para os analitos alvos. A natureza química dos analitos alvos determina o tipo de recobrimento a ser usado. A seleção do recobrimento é baseada primariamente nas características de polaridade e volatilidade dos analitos (PAWLISZYN, 1999). Na Tabela 1 estão representados alguns tipos de fibras utilizadas em SPME com as respectivas características (VALENTE, AUGUSTO, 2000).

Tabela 1. Características da fase estacionária usada para técnica de SPME

Fase estacionária	Polaridade	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Apolar	Cromatografia Gasosa e Líquida
Poliacrilato (PA)	Polar	Cromatografia Gasosa e Líquida
Divinilbenzeno-Carboxen- Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS)	Ampla faixa de polaridade	Cromatografia Gasosa
Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	Bipolar	Cromatografia Gasosa

Fonte: Bortoluzzi (2007).

A temperatura de extração influencia na solubilidade dos analitos e assim no processo de partição entre as duas fases. Em geral, um aumento na temperatura da extração provoca um aumento na velocidade de extração e diminuição na constante de distribuição, reduzindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de extração (LANÇAS, 2004). No entanto, elevadas temperaturas podem diminuir o coeficiente de distribuição entre a fase estacionária e o analito (OLIVARES, 2006).

O tempo de extração é fundamental na técnica de SPME, pois esta técnica é baseada no equilíbrio do processo de distribuição, e a máxima quantidade de analito deverá ser extraída quando o tempo de equilíbrio for estabelecido (HERNANDO, 2002). Para compostos cujos valores para o coeficiente de partição são baixos o tempo necessário é longo, e então um tempo inferior ao ideal pode ser escolhido. A otimização do tempo de contato entre a fibra e a amostra é fundamental para obter o máximo de sensibilidade (LANÇAS, 2004).

Através da agitação da amostra conseguimos diminuir o tempo necessário para atingir o equilíbrio, porque ela aumenta a difusão dos analitos em direção as fibras. Na extração por *headspace*, a agitação facilita a transferência de massa entre a fase aquosa e o *headspace* (HERNANDO, 2002).

O pH apresenta forte influência na sensibilidade da extração. Em meio aquoso, o pH afeta o equilíbrio de dissociação. Uma diminuição do

pH provoca aumento na concentração de espécies neutras de compostos ácidos, aumentando a quantidade extraída. Em geral, para compostos de caráter ácido ou básico, é imprescindível um ajuste de pH da amostra para que se obtenha melhor desempenho na extração. No entanto, deve-se tomar cuidado no caso da extração direta, pois valores extremos de pH, tanto altos como baixos danificam a fibra (LANÇAS, 2004).

A eficiência da extração pode ser melhorada pelo fenômeno conhecido como *salting out*, que consiste na adição de sal na amostra como o NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou Na_2CO_3 (LORD; PAWLISZYN, 2000; THEODORIS; KOSTER; JONG, 2000), principalmente para analitos mais polares. Concentrações de sal entre 1 e 30% têm sido empregados na análise de amostras aquosas. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fibra (LANÇAS, 2004). No entanto, este efeito não é geral e depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz da amostra (HERNANDO, 2002). Em alguns casos que engloba analitos altamente polares ou passíveis de sofrer dissociação iônica em meio aquoso, este aumento da força iônica pode provocar efeito contrário e provocar uma diminuição da eficiência da extração.

A associação adequada do tempo e temperatura de dessorção da fibra do injetor (operado no modo *splitless*) e a programação de temperatura da coluna são de vital importância para análise em SPME, uma vez que esta associação pode encaminhar os analitos através de uma condição adequada ao detector de um melhor sinal (OLIVARES, 2006). Uma dessorção eficiente e rápida transferência dos analitos para o injetor e coluna requerem alta velocidade de fluxo linear do gás carreador ao redor do descobrimento (PAWLISZYN, 1999).

A SPME apresenta como limitação baixos valores de recuperação em ensaios (ULRICH et al., 1999), portanto, são necessários equipamentos de alta detectabilidade. Outra desvantagem relacionada ao uso da SPME é o preparo da amostra para uso em cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), devido à fragilidade apresentada pelas fibras de extração perante solventes orgânicos, sendo que somente solventes de alta polaridade devem ser utilizados para o processo de dessorção (SUPELCO, 2009). E por fim, o número de fibras disponível comercialmente é pequeno, o que limita a seletividade da técnica. Tal seletividade pode ser modificada, por exemplo, através da obtenção de polímeros pelo processo sol-gel (CHONG et al., 1997).

1.7 REOLOGIA

O conhecimento das propriedades reológicas de alimentos, como produtos lácteos fermentados, é de extrema importância no planejamento de processos, manuseio e dimensionamento de equipamentos (PENNA; SIVIERI; OLIVEIRA, 2001), controle de qualidade, estocagem e processamento (PENNA; OLIVEIRA; BARUFFALDI, 1997; KULMYRZAEV et al., 2005), influenciando, conseqüentemente, a aceitação do produto pelo consumidor (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A reologia é a ciência que estuda a relação entre a deformação e o escoamento de matérias quando submetidas a uma determinada força ou pressão (CAMPOS, 1989; MULLER, 1997; RAO, 1999; ALVES, 2003). Com a resposta das determinações reológicas obtêm-se informações sobre a forma como um determinado material reage quando submetido a forças externas, ou seja, sabem-se informações a respeito da sua viscosidade e elasticidade (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; MEZA; VERDINI; RUBIOLO, 2009).

Uma propriedade dos fluidos é a viscosidade, que corresponde ao atrito interno de um fluido ou a tendência do mesmo em resistir ao escoamento (MULLER, 1997; RAO, 1999). Portanto, a viscosidade é dada pela relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, o que caracteriza o comportamento de fluxo dos alimentos fluidos, e assim os classifica em Newtonianos e não-Newtonianos (RAO, 1999; MACHADO, 2002; SCHRAMM, 2006). Quando um fluido apresenta relação linear entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, ou seja, a viscosidade é constante, ele é chamado de Newtoniano. Portanto, fluidos Newtonianos têm comportamento característico, onde a viscosidade não depende da taxa de deformação. Geralmente os alimentos Newtonianos são aqueles que contêm componentes de baixa massa molar (ex.: açúcares) e que não contêm grandes concentrações de polímeros dissolvidos (ex.: pectinas, proteínas e amidos) (RAO, 1999). Por outro lado, quando a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é constante e depende ainda do tempo de observação ou de forças de recuperação elástica, o fluido é chamado não-Newtoniano. A maioria dos alimentos fluidos são não-Newtonianos (MACHADO, 2002; ABU-JDAYIL, 2003; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; SCHRAMM, 2006).

Os fluidos não-Newtonianos podem ainda ser classificados em independentes ou dependentes do tempo e viscoelásticos. Os independentes do tempo dividem-se ainda em pseudoplásticos, nos quais

a viscosidade aparente do fluido diminui ao aumentar a taxa de deformação e em dilatantes, quando a viscosidade aparente aumenta com o aumento da taxa de deformação (CAMPOS, 1989; MACHADO, 2002). Ambos não necessitam de uma tensão de cisalhamento mínima para que seja iniciado o escoamento ou movimentação do fluido. Ainda dentro da classificação de fluidos não-Newtonianos independentes do tempo está o plástico de Bingham, que necessita de uma tensão de cisalhamento inicial para escoar e depois de atingida esta tensão, comporta-se como Newtoniano (CAMPOS, 1989; MACHADO, 2002). Um esquema dos fluidos independentes do tempo pode ser visualizado na Figura 4.

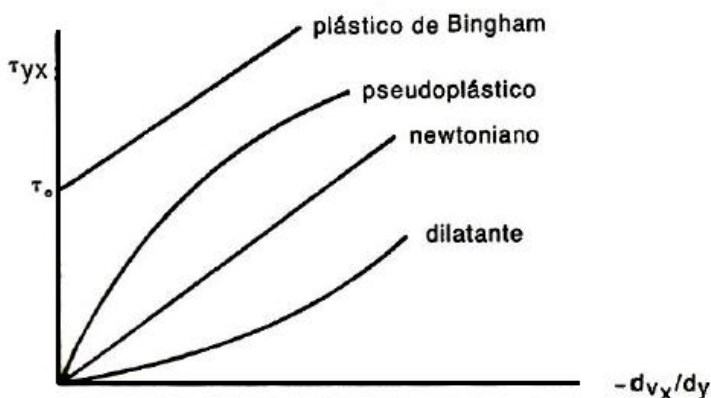


Figura 4: Reogramas dos fluidos independentes do tempo

Fonte: Lewis (1993).

Os fluidos dependentes do tempo classificam-se em tixotrópicos, onde a viscosidade aparente diminui com o aumento do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento (CAMPOS, 1989; BRETAS; D'AVILA, 2000), implicando na quebra da estrutura e em reopéticos, nos quais ocorre o comportamento inverso. Os fluidos viscoelásticos apresentam propriedades viscosas e elásticas conjugadamente. Quando a tensão de cisalhamento cessa, ocorre certa recuperação da deformação (LUCEY, 2004). O comportamento de fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo está esquematizado na Figura 5.

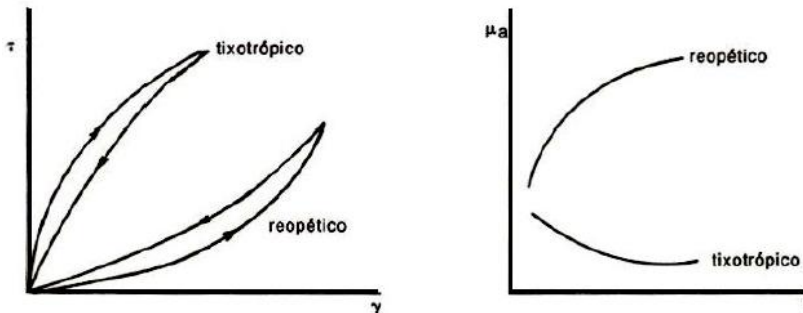


Figura 5: Reogramas para fluidos independentes do tempo

Fonte: Lewis (1993).

Na maioria das vezes os fluidos são submetidos a processos ascendentes e descendentes de tensão de cisalhamento a fim de obter o grau de tixotropia, o qual é definido como uma diminuição contínua da viscosidade aparente com o tempo numa determinada tensão e subsequente recuperação da viscosidade quando se interrompe o fluxo (KOKSOY; KILIC, 2004; SCHRAMM, 2006).

Para descrever o comportamento mecânico de vários materiais, como os obtidos no diagrama tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação, são utilizados modelos reológicos (RAO, 1999; ALVES, 2003). No entanto, apesar de apresentarem um domínio de validade limitado, os parâmetros neles envolvidos permitem comparar diferentes materiais, podendo tornar-se muito úteis no controle de qualidade e otimização de processos (ALVES, 2003).

Por conveniência, os modelos matemáticos podem ser divididos em tempo-independentes, que incluem o modelo Newtoniano, Lei de Potência, Herschel-Bulkley e Casson; e tempo-dependentes do comportamento de fluxo, onde podem ser citados os modelos de Weltman e Tiu e Boger (RAO, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, v. 57, p. 97-102, 2003.

ALVES, M. M. M. A Reologia. *In*: de Castro, A.G. **A química e a reologia no processamento dos alimentos**. Lisboa: Instituto Piaget, p. 37-61, 2003.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche: principios e aplicaciones**. Zaragoza: Acribia, p. 547, 1991.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, p. 1559-1597, 1999.

BEHMER, M. L. A. **Laticínios**. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1998.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 15 ed., São Paulo: Nobel, p. 320, 1991.

BELTRAN, J.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 389-404, 2000.

BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; ADILOV, E. F. Production of amino acids by yogurt bacteria. **Biotechnological Progress**, v. 14, p. 963-965, 1998.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 2/3, p. 125-131, 2002.

BIROLLO, G. A.; REINHEIMER, J. A. VINDEROLA, C. G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, v. 33, p. 799-805, 2000.

BONCZAR, G.; WSZOLEK, M.; SIUTA, A. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. **Food Chemistry**, v. 79, p. 85-91, 2002.

BORTOLUZZI, J. H. **Aplicação da técnica de SPME-CG-MS na determinação dos produtos voláteis gerados na degradação térmica de polímeros**. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BRASIL, Portaria 71. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas**. Diário Oficial da União de 21/09/2004.

BRETAS, R. E. S.; D'AVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. São Carlos: EdUFSCAR, p. 196, 2000.

BUDZIAK, D. **Desenvolvimento e aplicação de fases extratoras para técnicas de preparação de amostras**. 2009. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Florianópolis, 2009.

CAMPOS, S. D. S. **Reologia e textura em alimentos**. Campinas: ITAL, p. 84, 1989.

CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; BARRETO, P. L. M.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIA, E. S. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages, **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, 2009.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient election criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, Long Hanborough, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.

CHEN, C.; WALKER, W. A. Probiotics and Prebiotics: Role in Clinical Disease States. **Advances in Pediatrics**, v. 52, p. 77-113, 2005.

CHONG, S. L.; WANG, D. X.; HAYES, J. D.; WILHITE, B. W.; MALIK, A. Sol-Gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 9, p. 3889-3898, 1997.

CHR HANSEN. **The probiotic effects of LA - 5® and BB - 12®**. Horsholm, 2004.

COLLINS, C.H. **Princípios básicos de cromatografia**. 3. ed. Campinas: Unicamp, p. 236, 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, p. 453, 2006.

ÇON, A.; ÇAKMAKÇI, S.; ÇAĞLAR, A.; GÖKALP, H.Y. Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in Turkey. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 4, p. 402-406, 1996.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida lacteal e leite fermentado adicionados de probióticos, **Semina: Ciências Agrárias**. v. 20, n.1, p. 103-116, 2008.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P. A influência do soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 23-33, 2009.

DAHMER, A. M. **Gestão da Qualidade na Indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**, Campo Grande, 2006, p. 220. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Agronegócios, Universidade do Mato Grosso do Sul (UFMS).

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

EDWARDS, D. I. **Chromatography: principles and techniques**. London: Butterworths, p. 83, 1970.

EISERT, R., LEVSEN, K., Solid-phase microextraction coupled to gás chromatography: a new method for the analysis of organics in water, **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 143, 1996.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.37 (suppl), p. 88-93, 2003.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

FERNÁNDEZ-BAÑARES, F.; ROSINACH, M.; ESTEVE, M.; FORNÉ, M.; ESPINÓS, J. C.; VIVER, J. M. Sugar malabsorption in functional abdominal bloating: A pilot study on the long-term effect of dietary treatment. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 824– 831, 2006.

FERNANDEZ-GARCIA, E.; MCGREGOR, J. U. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yoghurt. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2934-2939, 1994.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária. Universidade Federal de Viçosa, p. 96, 1996.

FERREIRA, C. L. L. F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 22-25, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, p. 34, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 15 setembro 2009. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FUENTE, M. A. de la; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 361-369, 2002.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GUEIMONDE, M.; JALONEN, L.; HE, F.; HIRAMATSU, M.; SALMINEN, S. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. **Food Research International**, v. 39, p. 467–471, 2006.

HERNANDO, A. M. P. **Aplicación de la microextracción em fase sólida al análisis medioambiental**. 2002. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Universitat Rovira Virgili, Tarragona, 2002.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109–116, 2002.

IMHOF, R.; GLATTLI, H.; BOSSET, J. O. Volatile organic compounds produced by thermophilus and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 27, p. 442-449, 1994.

IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMENEZ-FLORES, R. Rapid Simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2122-2129, 2002.

JAMES, C. S. **Analytical chemistry of foods**. Londres: Blackie Academic & Professional, p. 178, 1995.

KNEIFEL, W.; JAROS, D.; ERHARD, F. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt-related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 179-189, 1993.

KOKSOY, A.; KILIC, M. Use of hidrocolloids in the textural stabilization of a yogurt drink, ayran. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 593-600, 2004.

KULMYRZAEV, A.; DUFOUR, É.; NOE, Y.; HANAFLI, M.; KAROUI, R.; QANNARI, E.M.; MAZEROLLES, G. Investigation at the molecular level on soft cheese quality and ripening by infrared and fluorescence spectroscopies and chemometrics - relationships with rheology properties. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 669-678, 2005.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, p.254, 1993.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase sólida**. São Carlos: RiMa, p.96, 2004.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, p. 211, 1999.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002.

LEWIS, M. J. **Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 494, 1993.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17-63, 2000.

LORENZEN, P. C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic crosslinking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 152-157, 2002.

LUCEY, J. A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 77-84, 2004.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

MACHADO, J. C. V. **Reologia e escoamento de fluidos: ênfase na indústria do petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência: PETROBRÁS, p. 257, 2002.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, p. 599, 1996.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução **normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/index.htm>. Acesso em setembro de 2009.

MARSHALL, V. M. E.; COLE, W. M.; MABBITT, L. A. Yogurt made from single starter organisms using heat-treated or enzyme-treated milk or Milk to which casein hydrolysate or sodium formate is added. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 147, 1982.

MARTINS, J. F. P.; LUCHESE, R. H. Determinação da compatibilidade de crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 43, n. 256, p. 11-13, 1988.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

MEZA, B. E.; VERDINI, R. A.; RUBIOLO, A. C. Viscoelastic behavior of heat-treated whey protein concentrate suspensions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 661–666, 2009.

MOTLAGH, S., PAWLISZYN, J., On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography, **Analytical Chimica Acta**, v. 284, p. 265, 1993.

MULLER, H.G. **Introducción a la reología de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 174, 1997.

NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 583–592, 2005.

NOZIÈRE, P.; GRAULET, B.; LUCAS, A.; MARTIN, B.; GROLIER, P.; DOREAUS, M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 3-4, p. 418-450, 2006.

O'REILLY, J.; WANG, O.; SETKOVA, L.; HUTCHINSON, J. P.; CHEN, Y. LORD, H. L.; LINTON, C. M.; PAWLISZYN, J. Automation of solid phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 15, p. 2010-2022, 2005.

O'DONNELL, H. J.; BUTLER, F. Time-dependent viscosity of stirred yogurt. Part I: coquette flow. **Journal of Food Engineering**, v. 51, p. 249-254, 2002.

OLIVARES, I. R. B. **Desenvolvimento, otimização e validação da técnica HS-SPM-GC/MS para análise de amostras obtidas do Rio Atibaia através da aplicação de uma sistemática "ISO" para diagnóstico ambiental de áreas contaminadas**. 2006. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, 2006.

OLIVEIRA, M. N. O.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAADA, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002a.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P. CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverage containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002b.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos - Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2. p. 279, 2005.

OTT, A.; GERMOND, J. E.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Aroma comparisons of tradicional and mild yoghurts: Headspace gás chromatography quantification of volatiles and origin of α -diketones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2379-2385, 1999.

OTT, A.; HUGI, A.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Sensory investigation of flavour perception: mutual influence of volatiles and acidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 441-450, 2000.

PAWLISZYN, J.; Applications of Solid Phase Microextraction, **RSC Chromatography Monographs**, 1999.

PEÑALVER, A., POCURULL, E., BORRULL, F., MARCÉ, R. M. Trends in solidphase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples, **Trends in Analytical Chemistry**, p. 557, 1999.

PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, M. N.; BARUFFALDI, R. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 98-101, 1997.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relation between quality and rheological properties of latic beverages. **Journal of Food Engineering**, v. 49, p. 7-13, 2001.

PINHO, O.; PERES, C.; FERREIRA, I. Solid-phase microextraction of volatile compounds in Terrincho ewe cheese. Comparison of different fibers. **Journal of Chromatography**, v. 1011, p. 1-9, 2003.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMANCALENTY, K. M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technoogy**, Amsterdam, v. 13, p. 3-11, 2002.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, **Química Nova**, v. 24, n. 1p. 68-76, 2001.

RADKE-MITCHELL, L.; SANDINE, W. E. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: A review. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 245-248, 1984.

RAO, M.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. Gaithersburg: An Aspen Publication, p. 433, 1999.

RESA, P.; BOLUMAR, T.; ELVIRA, L.; PÉREZ, G.; ESPINOSA, F. M. de. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1083–1091, 2007.

RODAS, M. A. B.; RODRÍGUEZ, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 304-309, 2001.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados - uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, 1997.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K.; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. **Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 275-280, 1996.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERMON-CARTER, E.J. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers, **International Dairy Science**, v. 14, p. 151-159, 2004.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, p. 237, 2006.

SCHREZENMEIER, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73 (suppl), p. 361- 364, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NUMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

SNOW, N. H. Solid phase micro-extraction of drugs from biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 445-455, 2000.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, p. 617, 1991.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. **Challenges facing development of probiotic-containing functional foods**. In: FARNWORTH, E. R., ed. Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, p. 27-58, 2003.

SUPELCO. **SPME Applications Guide**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8700/8652.pdf>>. Acesso em: 29 de outubro de 2009.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.

THEODORIS, G.; KOSTER, E.; JONG, G. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 475, p. 49-82, 2000.

ULRICH, S. Solid-Phase Microextraction in Biomedical Analysis, **Journal of Chromatography A**, v.902, p.167-194, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por Fase Sólida. **Química nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, p. 476, 1994.

VEDAMUTHU, E. R. The yogurt story – past, present and future. Part VI. Dairy, **Food and Environmental Sanitation**, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

VILELA, D. A. A importância econômica, social e nutricional do leite. **Revista Batavo**, v. 8, n. 111, jan, 2002.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIRBERTO, D. REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese, **Journal Dairy Science**, v.83, n.9, p. 1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C.G; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

WALSTRA, P. **Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos lácteos**. Madrid, Espanha. Ed Acribia, 2001.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2ª Ed., Boca Raton, Florida, EUA, p. 781, 2006.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.

ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; JUNIOR, W. S.; ZANELA, C.; MARQUES, L. T.; MARTINS, R. P. G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.1, p. 153-159, 2006.

ZELDA, P. Varian Chromatography Systems, SPME, Varian Application Note, nº6, 1996.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO SOB REFRIGERAÇÃO

Parte deste trabalho foi apresentado na forma de resumo no *SIMCRO - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins*, Campos do Jordão, São Paulo, Brasil, 14 a 16 de setembro de 2010. (ANEXO A).

Parte deste trabalho foi apresentado na forma de resumo no *XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Salvador, Bahia, Brasil, 07 a 10 de novembro de 2010 (ANEXO B).

Artigo submetido à publicação no *International Journal of Food Science and Technology* (ISSN: 0975-8402) (ANEXO C).

ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA DE IOGURTE PROBIÓTICO MANTIDO SOB REFRIGERAÇÃO

RESUMO

Dois iogurtes, um contendo culturas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus debriueki* subsp. *bulgaricus*, e um probiótico, adicionado também de *Bifidobacterium* BB-12, foram elaborados e analisados quanto ao teor de sólidos totais, proteína, pH e composição volátil durante armazenamento refrigerado por 28 dias. O iogurte probiótico foi analisado também quanto à viabilidade da bactéria probiótica. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para otimizar a extração dos compostos voláteis do iogurte probiótico através da microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Pós-acidificação e decréscimo no conteúdo de proteína foram observados em ambos os iogurtes durante o armazenamento. Na extração de maiores quantidades de compostos voláteis, os resultados mostram que a temperatura de extração e a adição de sal foram estatisticamente os fatores mais determinantes. Os compostos voláteis identificados no iogurte probiótico foram a 2-butanona, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, acetona e o ácido hexanóico. Durante os 28 dias de armazenamento, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona e ácido hexanóico.

Palavras-chave: iogurte probiótico, compostos voláteis, *Bifidobacterium* BB-12, microextração em fase sólida, metodologia de superfície de resposta.

ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IN PROBIOTIC YOGURT DURING STORAGE THROUGH SOLID-PHASE MICROEXTRACTION GAS CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Two yogurts, one containing cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrücki* subsp. *bulgaricus*, and a probiotic, also added of the *Bifidobacterium* BB-12 were elaborated and analyzed for total solids, protein, pH and volatile composition during storage for 28 days. The probiotic yogurt was also analyzed as the viability of probiotic bacteria. The response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction of volatile compounds from the probiotic yogurt through solid phase microextraction by headspace (HS-SPME) combined with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Post-acidification and decrease in protein content were noted in both yogurts during storage. In the extraction of larger amounts of volatile compounds, the results showed that the extraction temperature and the addition of salt were statistically the most determinant factors. The volatile compounds detected in the probiotic yogurt were 2-butanone, 2,3-butanodione, 2,3-pentanodione, acetone and hexanoic acid. During the 28 days of storage, were noted significantly difference ($p < 0.05$) between the amounts of 2,3-butanodione, 2,3-pentanodione and hexanoic acid.

Keywords: Probiotic yogurt, volatile compounds, *Bifidobacterium* BB-12, solid-phase microextraction, response surface methodology.

1. INTRODUÇÃO

O sabor é um dos fatores determinantes na escolha e aceitação de um iogurte pelo consumidor. De acordo com pesquisadores, o aroma e o sabor de derivados lácteos devem-se basicamente pela produção de ácidos voláteis e não-voláteis e de compostos carbonílicos (FERNANDEZ-GARCIA; MCGREGOR, 1994). Alguns estudos relatam que apenas um grupo de compostos orgânicos voláteis (carbonílicos) parece ter influência decisiva no aroma final do iogurte devido às suas altas concentrações em comparação com os demais (IMHOF, GLATTLI, BOSSET, 1994). Pesquisas realizadas com culturas iniciadoras (*starters*) em iogurtes e outros derivados lácteos incluem apenas o acetaldeído, diacetil, etanol, propanona e 2-butanona como compostos de relativa importância no aroma de iogurtes. É notável que em leites fermentados as dicetonas vicinais como a 2,3-butanodiona e a 2,3-pentanodiona são consideradas compostos chave na identificação do seu aroma final (IMHOF, GLATTLI; BOSSET, 1994; OTT; FAY; CHAINTREAU, 1997).

Os derivados lácteos transmitem uma idéia de saúde, a qual pode ser melhorada através da adição de bactérias probióticas com propriedades terapêuticas, como o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nestes produtos. Porém, é importante que a contagem de bactérias probióticas viáveis não diminua de 10^6 UFC/g durante a vida de prateleira do produto para que haja número suficiente deste grupo microbiano para exercer seus efeitos terapêuticos (CHEN; WALKER, 2005). Os probióticos devem cumprir uma série de requisitos básicos para o seu desenvolvimento e venda ao consumidor. Estes requisitos incluem a sobrevivência, a atividade, e a estabilidade durante o seu armazenamento. Além disso, os probióticos não podem afetar negativamente o sabor e o aroma do produto ou sua acidificação ao longo da sua vida de prateleira.

O perfil volátil reflete a imagem do sabor e aroma de um iogurte. Uma quantidade significativa de compostos voláteis denominados *off-flavors*, podem se desenvolver durante o armazenamento de derivados lácteos. Muitas reações químicas incluindo a oxidação lipídica, reação de Maillard e/ou degradação de aminoácidos podem levar a alteração do sabor e ao desenvolvimento destes compostos *off-flavors* (MORR; HA, 1990). Compostos voláteis podem ainda se perder durante o armazenamento e conseqüentemente diminuir seu sabor.

Os compostos voláteis estão geralmente presentes em quantidades muito pequenas (traços) e por isso, é utilizado para análise por cromatografia gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa (MS), com uma etapa prévia envolvendo a extração e a pré-concentração da fração volátil. Este tipo de análise é um desafio para muitos pesquisadores. A microextração em fase sólida (SPME) é um método desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores (ZHAN; YANG; PAWLISZYN, 1994) e tornou-se um método opcional para análise de aromas, com um preparo de amostras rápido e isento de solventes, com baixo custo e de fácil operação. Além disso, é sensível, seletivo e compatível com baixos limites de detecção. Com estas vantagens, a SPME é amplamente empregada na extração de compostos voláteis e semi-voláteis de amostras biológicas, ambientais, alimentares e alguns tipos de bebidas (KATAOKA LORD; PAWLISZYN, 2000). Ao utilizar o método *headspace* (HS) SPME, é possível diminuir o efeito da matriz e todos os outros interferentes presentes na amostra líquida. Por outro lado, o equilíbrio é atingido mais rapidamente através da HS-SPME do que pela imersão direta (ID), pois não há nenhum líquido para interromper a difusão dos analitos para o revestimento da fibra (YANG; PEPPARD, 1994).

Em relação aos derivados lácteos, a técnica de SPME pode ser usada para determinar a vida de prateleira de iogurte e queijo fresco (CONDURSO et al., 2008), para analisar quantitativamente os compostos voláteis derivados do aquecimento do leite (VAZQUEZ-LANDAVEVERDE et al., 2005), e para avaliar o impacto do processamento e/ou armazenamento na estabilidade do sabor de soro de leite em pó (WRIGHT et al., 2008). No entanto, não existem estudos publicados relatando o perfil e quantificação de compostos voláteis de iogurtes probióticos durante o armazenamento refrigerado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de compostos voláteis de iogurte probiótico, utilizando a metodologia de superfície de reposta (MSR), através da microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) a fim de extrair, identificar e quantitativamente monitorar a concentração de compostos voláteis do iogurte probiótico durante armazenamento refrigerado por 28 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Leite pasteurizado padronizado (3 % de gordura), cultura termofílica (YCX-11[®], Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca) contendo *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* e cultura láctea contendo *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca) liofilizada - DVS - (*Direct Vat Set*) foram utilizados na elaboração dos iogurtes. Meio de cultura MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, Merck, Darmstadt, Alemanha), cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), propionato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e AnaeroGen[®] (Oxoid, Hampshire, UK) foram utilizados para as análises microbiológicas. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico.

2.2 PADRÕES CROMATOGRÁFICOS

Acetona (2-propanona), diacetil (2,3-butanodiona), 2,3-pentanodiona, 2-butanona e ácido hexanóico foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes foram de grau analítico ou cromatográfico.

2.3 ELABORAÇÃO DOS IOGURTES

Dois iogurtes, um denominado controle e outro probiótico, foram elaborados de acordo com metodologia proposta por Almeida, Bonassi e Roça (2001) com algumas modificações. O leite (1 L) foi aquecido até atingir a temperatura de 40 ± 1 °C e então inoculado com a cultura termofílica, no entanto, no iogurte probiótico também foi adicionado a cultura contendo *Bifidobacterium* BB-12. As culturas foram inoculadas nas seguintes concentrações 0,0032 % (m/v) e 0,0200 % (m/v), respectivamente. Ambos os iogurtes foram fermentados a 40 ± 1 °C até o pH 4,6. Após o período de fermentação, os iogurtes foram resfriados a 4 ± 1 °C, gentilmente batidos, e armazenados em copos plásticos selados com alumínio sob refrigeração (4 ± 1 °C) até a realização das análises. Todas as análises foram realizadas nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento.

2.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A viabilidade da bactéria probiótica foi monitorada no iogurte probiótico durante o armazenamento. Para a contagem de células probióticas viáveis, foi utilizado ágar MRS modificado com adição de 0,2 % (m/v) de cloreto de lítio e 0,3 % (m/v) de propionato de sódio (LP-MRS) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). As placas foram incubadas em jaras de anaerobiose contendo AnaeroGen[®] a 37 ± 1 °C por 72 h. Após o período de incubação, a contagem de células probióticas viáveis foi expressa como unidades formadoras de colônia por mililitro de iogurte (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os iogurtes (controle e probiótico) foram avaliados quanto ao teor de sólidos totais por secagem direta em estufa a 85 °C (% m/m) e quanto ao teor de proteína através do método Kjeldahl ($N \times 6,38$) (% m/m) (AOAC, 2005). Os valores de pH foram determinados em pH metro (Quimis, modelo Q-400A, Brasil) através do método potenciométrico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ATRAVÉS DE GC-MS

Otimização dos parâmetros de HS-SPME. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para determinar a condição ótima de extração de compostos voláteis das amostras de iogurte por HS-SPME. Para isto foi empregado o Delineamento Central Composto (DCC) com três variáveis independentes: temperatura de extração (40 a 60 °C), tempo de extração (30 a 50 minutos) e concentração de NaCl (0 a 6 g). Os níveis selecionados para as variáveis foram baseados em estudos prévios (dados não mostrados). O delineamento experimental foi composto de dezessete ensaios, sendo oito fatoriais (níveis -1 e 1), seis pontos axiais (níveis -1,682 e 1,682) e três repetições no ponto central, como mostra a Tabela 1. Devido ao erro sistemático, todos os experimentos foram realizados de forma aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inexplicável sobre as respostas obtidas. A resposta avaliada durante todo o experimento foi a soma total das áreas de todos os picos cromatográficos, obtidos nas análises de GC-MS.

Tabela 1. Delineamento Central Composto (DCC) com as variáveis independentes e seus níveis utilizados para o delineamento experimental.

Ensaio	Níveis		
	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Concentração de NaCl (g)
1	-1 (40)	-1 (30)	-1 (0)
2	1 (60)	-1 (30)	-1 (0)
3	-1 (40)	1 (50)	-1 (0)
4	1 (60)	1 (50)	-1 (0)
5	-1 (40)	-1 (30)	1 (6)
6	1 (60)	-1 (30)	1 (6)
7	-1 (40)	1 (50)	1 (6)
8	1 (60)	1 (50)	1 (6)
9	-1,68 (38,32)	0 (40)	0 (3)
10	1,68 (61,68)	0 (40)	0 (3)
11	0 (50)	-1,68 (28,32)	0 (3)
12	0 (50)	1,68 (51,68)	0 (3)
13	0 (50)	0 (40)	-1,68 (1,68)
14	0 (50)	0 (40)	1,68 (7,68)
15	0 (50)	0 (40)	0 (3)
16	0 (50)	0 (40)	0 (3)
17	0 (50)	0 (40)	0 (3)

$\alpha = \pm 1,68$ para três variáveis independentes

Valores codificados (entre parênteses) e valores reais utilizados em todo delineamento experimental para extração dos compostos voláteis.

A extração por SPME foi realizada usando uma fibra recoberta por DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano) com 50/30 μm de espessura (Supelco, Bellefonte, PA, USA), alojada em um *holder* (aplicador) manual (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Antes do uso, a fibra foi acondicionada a 270 °C por 1 hora. Uma amostra de 20 g foi colocada em um frasco de vidro fechado com tampa (Supelco, Bellefonte, PA, USA) para a realização da extração. Durante a extração as amostras foram continuamente agitadas por uma barra magnética em uma placa magnética giratória a 750 rpm. A fibra foi cuidadosamente introduzida sempre no mesmo lugar do frasco de vidro para a exposição no *headspace* para obter máxima repetibilidade. Após a amostragem, a

fibra de SPME foi introduzida no injetor do GC-MS, colocado no modo *splitless* e mantida a temperatura de 270 °C por 10 minutos para desorção térmica dos analitos. Cada amostra foi analisada em triplicata utilizando um novo frasco e alíquota para cada replicata.

Análise através de GC-MS. Um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-2010 acoplado ao espectrômetro de massa foi utilizado para analisar os componentes presentes no *headspace* das amostras. Gás Hélio (99,999 %) foi utilizado como gás carreador. A coluna capilar utilizada foi a Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm d_f) (Restec, USA). A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C por 1 minuto e elevada para 120 °C a taxa de 4 °C/minuto, e finalmente a 280 °C a taxa de 15 °C/minuto. A temperatura do injetor utilizada foi 270 °C e o tempo de dessorção da fibra na porta do injetor foi de 10 minutos. A temperatura utilizada no detector foi de 250 °C. O impacto dos elétrons no espectro de massa foram gravados com uma tensão de 70 eV sobre um intervalo de massas de 40-400 *m/z*.

2.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos espectros obtidos experimentalmente com os da Biblioteca NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versão 1.7, USA) e por comparação com os tempos de retenção dos respectivos padrões cromatográficos.

2.8 ANÁLISE QUANTITATIVA

Os teores de acetona (2-propanona), diacetil (2,3-butanodiona), 2,3-pentanodiona, 2-butanona e ácido hexanóico foram quantificados. Para a quantificação de cada pico cromatográfico foi requerido uma relação sinal ruído de no mínimo de 5 (*S/N*). Resultados quantitativos foram obtidos utilizando o método da adição de padrão. Soluções padrões foram adicionadas a múltiplas alíquotas de amostras de iogurte. A amostra sem adição de padrão também foi analisada. Os compostos voláteis das amostras foram extraídos e analisados através de HS-SPME/GC-MS, como descrito previamente. Os compostos foram quantificados com base na curva de calibração que foi gerada através da plotagem da resposta detectada *versus* a quantidade fortificada de cada padrão. Cada análise foi realizada em triplicata.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes de regressão dos efeitos lineares, quadráticos e de interação dos termos foram determinados usando a regressão linear múltipla (RLM). O teste *t*-Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão derivados do modelo. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo e determinar as diferenças significantes entre as amostras de iogurtes em todos os parâmetros avaliados. Os coeficientes de regressão foram utilizados para gerar a superfície de resposta. Todos os cálculos e gráficos do delineamento experimental foram construídos utilizando o *software* STATISTICA 6.0 (Statsoft 1984-2001, Tulsa, OK, USA). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Em relação à viabilidade das células de *Bifidobacterium* BB-12, o iogurte foi considerado probiótico durante o período avaliado, pois não houve decréscimo da contagem de células viáveis entre o 1º e o 28º dia de armazenamento sob refrigeração ($8,9 \times 10^7$ e $7,0 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente). Chen e Walker (2005) afirmam que a contagem recomendada de células probióticas viáveis em um alimento deve ser igual ou superior a 10^6 UFC/mL durante o seu armazenamento e que a melhor maneira de administrá-los é através da ingestão regular, o que confere a presença destes microrganismos em alta concentração nos intestinos, para manter ou melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal. Resultados similares foram encontrados por Saarela et al. (2006), ao avaliarem a estabilidade de cepas de *B. animalis* subsp. *lactis* em leite desnatado e em sucos de frutas e observaram que as cepas permaneceram estáveis no leite por duas semanas, enquanto que a mesma estabilidade não foi observada nas amostras de sucos. Cunha et al. (2009) avaliaram a estabilidade de *Bifidobacterium* em bebidas lácteas fermentadas adicionadas com soro e também observaram a estabilidade da bactéria probiótica durante o armazenamento de seus produtos.

3.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os valores médios de sólidos totais, proteína e pH de ambos iogurtes são apresentados na Tabela 2. Quando as amostras foram comparadas nos mesmos dias de armazenamento não foram observadas diferenças significativas nos teores de sólidos totais. Os valores encontrados foram inferiores ao de Cunha et al. (2009) em leite fermentado sem adição de soro de leite.

Tabela 2. Valores de sólidos totais, proteína e pH do iogurte controle e probiótico, nos dias 1, 14 e 28 de armazenamento a 5 ± 1 °C.

Amostras	Dias	*ST	**Proteínas	pH
Controle	1	11,28 ^{A,a} $\pm 0,02$	2,76 ^{A,a} $\pm 0,33$	4,75 ^{A,a} $\pm 0,01$
	14	11,23 ^{A,b} $\pm 0,04$	2,72 ^{A,a} $\pm 0,01$	4,74 ^{A,a} $\pm 0,00$
	28	11,33 ^{A,a} $\pm 0,05$	2,58 ^{A,b} $\pm 0,00$	4,62 ^{A,b} $\pm 0,00$
Probiótico	1	11,26 ^{A,a} $\pm 0,02$	2,73 ^{A,a} $\pm 0,00$	4,62 ^{B,a} $\pm 0,00$
	14	11,14 ^{A,b} $\pm 0,05$	2,65 ^{B,b} $\pm 0,01$	4,61 ^{B,b} $\pm 0,00$
	28	11,20 ^{B,b} $\pm 0,01$	2,67 ^{B,b} $\pm 0,03$	4,39 ^{B,c} $\pm 0,01$

*ST = Sólidos Totais. **Proteína = Nitrogênio total x 6.38.

^{A, B} Dentro da mesma coluna, letras maiúsculas sobrescritas diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de iogurte controle e probiótico para os mesmos períodos de armazenamento.

^{a, b, c} Dentro da mesma coluna, letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada iogurte estudado.

Os valores de proteína diminuíram durante o período de armazenamento ($p < 0,05$). Teores de proteína similares foram encontrados por Thamer e Penna (2005) em leite probiótico adicionado de soro. De acordo com Donkor e colaboradores (2006), tanto as bactérias probióticas como as utilizadas na produção do iogurte necessitam de peptídeos e aminoácidos para seu crescimento. As principais enzimas das bactérias lácticas, que são responsáveis pela proteólise das proteínas do leite, oferecem um aumento de aminoácidos e nitrogênio necessários para as bactérias fermentativas, ocasionando uma diminuição no teor de proteínas.

Os valores de pH observados foram similares aos encontrados em iogurte probiótico contendo bifidobactéria por Kempka et al. (2008). Lankaputhra e Shah (1997) relatam que valores de pH entre 4,0 e 5,0 são ideais para manutenção da viabilidade dos probióticos. Durante o armazenamento, foi observada a pós-acidificação dos iogurtes, no entanto, os valores de pH ainda permaneceram dentro dos valores recomendados. Kailasapathy (2006) afirma, que em temperatura de refrigeração entre 0 e 5 °C, ocorre a manutenção da atividade da β -galactosidase, que é responsável pela pós-acidificação do leite fermentado e também que a temperatura de refrigeração e o tempo de armazenamento do leite fermentado contribuem para a variação do pH.

3.3 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS ATRAVÉS DE GC-MS

Otimização dos parâmetros de HS-SPME. A Tabela 3 mostra os efeitos observados sobre os a extração dos compostos voláteis de iogurtes probióticos, além daqueles causados pela interação entre os fatores. O teste-*t* para o modelo foi significativo ($p < 0,05$) para o coeficiente quadrático da temperatura de extração e adição de sal (NaCl) e para a interação entre o tempo de extração e adição de sal, indicando que somente estas variáveis podem adequadamente explicar a variação observada na extração de compostos voláteis dentro dos níveis estudados neste trabalho.

Tabela 3. Resultados do perfil de variância dos compostos voláteis do iogurte probiótico através da análise por HS-SPME e GC-MS.

	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	Valor <i>F</i>	Valor <i>p</i>
Linear					
Temperatura (°C) (L)	0,355	1	0,355	0,001763	0,967680
Tempo (min) (L)	28,862	1	28,862	0,143297	0,716244
NaCl (g) (L)	50,893	1	50,893	0,252677	0,630622
Quadrático					
Temperatura (°C) (Q)	1596,636	1	1596,636	7,927125	0,025940*
Tempo (min) (Q)	251,653	1	251,653	1,249429	0,300551
NaCl (g) (Q)	1086,836	1	1086,836	5,396025	0,053164*
Interacção					
1L/2L	676,523	1	676,523	3,358863	0,109508
1L/3L	124,624	1	124,624	0,618747	0,457312
2L/3L	1139,306	1	1139,306	5,656529	0,049001*
Adequação do modelo	771,163	5	154,233	0,482930	0,778744
Erro puro	638,737	2	319,369		
Total SQ	8227,464	16			

L= efeito linear; Q= efeito quadrático; GL= graus de liberdade *Valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O modelo construído para a extração dos compostos voláteis de iogurte probiótico está representado na Eq. (1), sendo que a resposta (A) é a área total de todos os picos cromatográficos. A superfície de resposta foi plotada para facilitar a visualização dos fatores significativos derivados da análise estatística (Figura 1)

$$A = -458,006 + 20,295 T - 0,204 T^2 + 6,6485 s - 1,690 s^2 + 0,139 t s \quad (1)$$

Sendo que: A corresponde a área total de todos os picos cromatográficos, T corresponde ao termo linear da Temperatura de extração (°C), T² ao termo quadrático da Temperatura de extração (°C), s

ao termo linear da adição de NaCl (g) e t a interação entre o termo linear do tempo de extração com a adição de NaCl.

A região ótima para extração de compostos voláteis do iogurte probiótico foi obtida na temperatura de 50 °C com adição de 5 g de NaCl. Temperatura similar foi utilizada por Contarini e Povoło (2002) na extração de compostos voláteis de amostras de leite. Wercinski e Pawliszyn (1999) consideram que o uso de altas temperaturas durante a extração por *headspace* pode seletivamente concentrar certos compostos voláteis com o deslocamento de outros. Como reportado por Yang e Peppard (1994), a adição de sal aumenta a sensibilidade da extração de compostos voláteis por SPME devido ao efeito “*salting out*”. O tempo de extração foi fixado em 45 minutos, pois este não se mostrou significativo para o modelo.

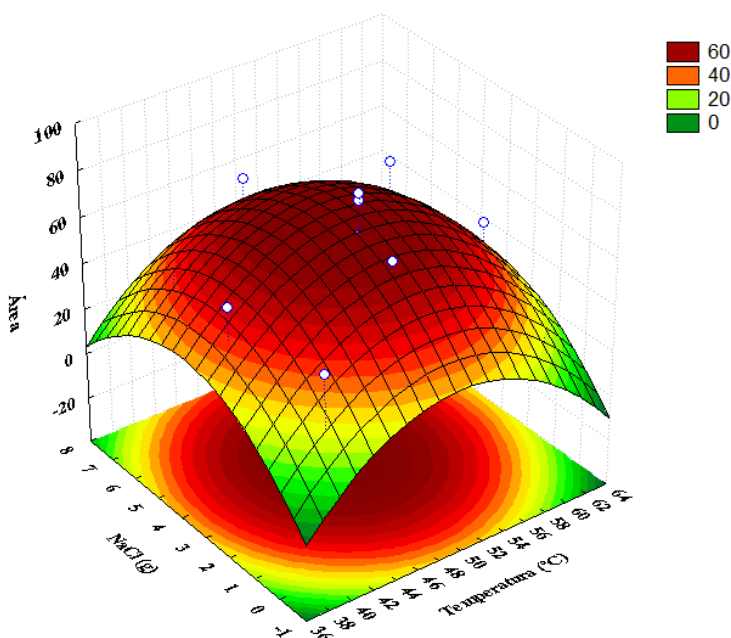
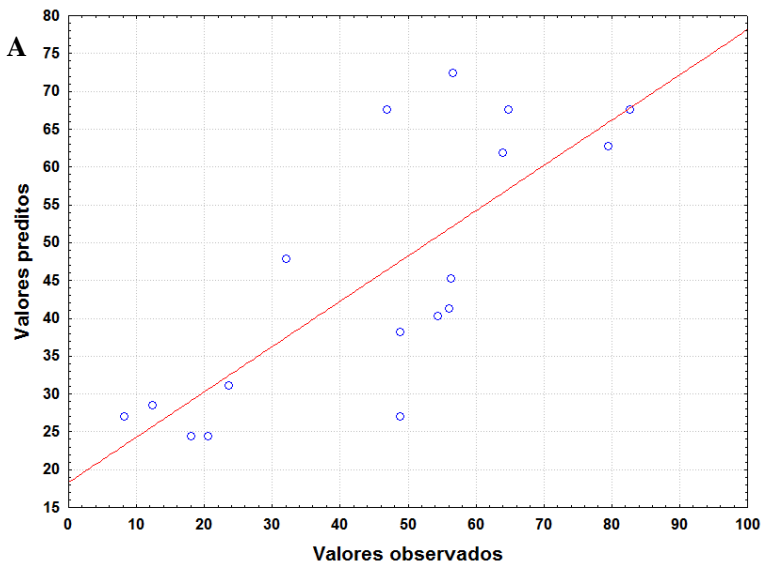


Figura 1: Superfície de resposta obtida pelo Delineamento Central Composto utilizando variáveis codificadas onde a resposta foi a área total dos picos cromatográficos. Tempo de extração fixado em 45 minutos.

A normalidade dos dados, a qual foi avaliada através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos e da diferença entre os valores observados e preditos a partir do modelo de regressão, mostram que os pontos experimentais foram distribuídos normalmente em torno da linha, indicando que a suposição de normalidade foi satisfeita (Figura 2). Um valor de coeficiente de determinação (R^2) de 0,83 foi obtido para este modelo, o que indica um bom ajuste entre os valores de reposta observados e preditos. O gráfico dos resíduos *versus* valores preditos (Figura 2 B) mostra que os resíduos distribuem-se aleatoriamente ao redor do zero. Assim, os resultados da análise de variância foram válidos bem como os pressupostos do modelo foram satisfeitos.



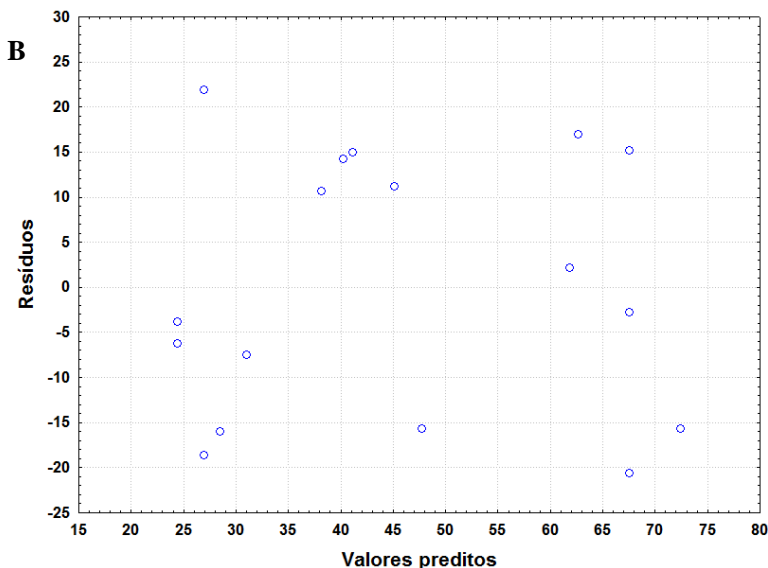


Figura 2: (A) Gráfico dos valores preditos *versus* valores observados. (B) Gráfico dos resíduos *versus* valores preditos para a área total dos compostos voláteis do iogurte probiótico.

Identificação e análise quantitativa de compostos voláteis através de GC-MS. Os compostos voláteis detectados no iogurte probiótico foram: 2-butanona, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, acetona e ácido hexanóico, como já previamente descrito por Imhof, Glattli e Bosset (1994) e Ott, Fay e Chaintreau (1997) como compostos responsáveis pelo aroma e sabor de iogurtes. Como o iogurte controle e probiótico mostraram o mesmo perfil de compostos voláteis, a quantificação foi realizada somente na amostra de iogurte probiótico durante o período de armazenamento sob refrigeração. Os valores dos compostos voláteis encontrados no iogurte probiótico podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração (mg/kg) de compostos voláteis do iogurte probiótico durante o armazenamento a 5 ± 1 °C.

Compostos	Dias de armazenamento		
	1 (m/m %)	14 (m/m %)	28 (m/m %)
2-butanona	2,93 ^a \pm 2,59	0,75 ^b \pm 3,45	3,11 ^a \pm 6,72
2,3-butanodiona	2,72 ^b \pm 8,41	2,94 ^b \pm 9,96	4,92 ^a \pm 8,39
2,3-pentanodiona	0,05 ^c \pm 7,26	0,09 ^b \pm 3,94	0,13 ^a \pm 3,73
Acetona	2,40 ^a \pm 6,10	1,89 ^b \pm 2,96	2,63 ^a \pm 6,04
Ácido hexanóico	0,85 ^c \pm 6,33	1,48 ^b \pm 2,19	1,92 ^a \pm 4,34

Média \pm desvio padrão relativo (n=3); letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$).

A composição volátil do iogurte probiótico permaneceu estável durante os 28 dias de armazenamento. Concurso et al. (2008) relatam que compostos voláteis são formados devido a inúmeras mudanças bioquímicas que ocorrem durante o processo de fermentação e armazenamento do iogurte.

Zourari, Accolas e Desmazeaud (1992) relatam que as dicetonas, 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona, presentes em iogurtes provêm unicamente do piruvato, uma vez que culturas termofílicas não são capazes de metabolizar citrato. De acordo com Tsau, Guffanti e Montville (1992) e Monnet e Corrieu (2007) espécies de *S. thermophilus* possuem uma α -acetolactato sintase e uma acetohidroxi ácido sintetase, que produzem α -acetolactato sintase e 2-hidroxiacetolactato, respectivamente, do piruvato. Como relatado por Monnet e Corrieu (2007), ambos α -aceto ácidos são metabolizados em compostos mais neutros para a manutenção da homeostase do pH. Estes ácidos podem ser convertidos em 2,3-butanodiona e 2,3 pentanodiona por espontânea descarboxilação em aminoácidos do leite de cadeia ramificada como a valina, leucina ou isoleucina ou por meio de mecanismos enzimáticos.

Tsau, Guffanti e Montville (1992) relatam que metil cetonas como a 2-butanona e acetona (2-propanona) derivam da β -oxidação de ácidos graxos e da descarboxilação de β -cetoácidos e, portanto, dependem da atividade lipolítica das cepas do iogurte.

Durante os 28 dias de armazenamento, foram observadas diferenças entre as quantidades de 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona e ácido hexanóico ($p < 0,05$). No primeiro dia de armazenamento, o composto 2-butanona foi encontrado em maiores quantidades, enquanto

no último dia (28º) a 2,3-butanodiona foi encontrada como composto majoritário. Este resultado está de acordo com a pesquisa de realizada por Xu, Boyslton e Glatz (2005), que quantificaram compostos voláteis de leite fermentado adicionado de probióticos e também observaram a predominância da 2,3-butanodiona. No entanto, Vazquez-Landaverde et al. (2005) observaram que a 2,3-butanodiona foi o segundo composto encontrado em maior quantidade nas amostras de leite estudadas.

A concentração de 2,3-pentanodiona aumentou durante os 28 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Resultados similares foram obtidos por Gallardo-Escamilla, Kelly e Delahunty (2005), com 0,07 mg de 2,3-pentanodiona por kilograma de iogurte.

A concentração de acetona encontrada no iogurte probiótico (2,40 mg/kg) manteve-se estável durante o armazenamento e foi maior do que a obtida por Serra et al. (2009) em iogurtes. Kneifel, Jaros e Erhard (1992) analisaram amostras de iogurte contendo *Bifidobacterium* spp. e detectaram quantidades significativas de 2-butanona, 2,3-butanodiona e acetona, que são consistentes com alguns compostos detectados no presente trabalho.

A concentração de ácido hexanóico aumentou durante o período de armazenamento ($p < 0,05$). Diferentes resultados foram obtidos por Concurso et al. (2008), que analisaram amostras de iogurtes após 30 dias de armazenamento sob refrigeração e encontraram quantidades de 4,9 mg/kg de ácido hexanóico e 2,1 mg/kg de 2,3-butanodiona.

4. CONCLUSÃO

Foi possível obter um iogurte probiótico (10^6 UFC/mL) durante os 28 dias de armazenamento sob refrigeração. Em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, ocorreu uma pós-acidificação dos iogurtes com redução dos teores de proteína durante o armazenamento. A região ótima para extração de compostos voláteis do iogurte probiótico foi obtida a temperatura de 50 °C com adição de 5 g de NaCl. A otimização do método resultou na identificação de cinco compostos voláteis que são considerados compostos chave do aroma e do sabor de iogurtes probióticos. A composição volátil das amostras de iogurtes permaneceu estável durante os 28 dias de armazenamento, e a 2-butanona, a 2,3-butanodiona e a acetona foram os compostos encontrados em maior quantidade no iogurte probiótico. Os resultados mostram que HS-SPME acoplada à espectrometria de massa pode ser considerada uma boa alternativa para extração, identificação e quantificação de compostos voláteis de iogurtes probióticos, além de ser um método simples, rápido e sem o uso de solventes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. S.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. *Official methods of analysis of the association analytical chemists*. 18. Ed. Maryland: AOAC, 2005.

CHEN, C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in Pediatrics**, v. 52, p. 77-113, 2005.

CONDURSO, C.; VERZURA, A.; ROMEO, V.; ZIINO, M.; CONTE, F. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 819–825, 2008.

CONTARINI, G.; POVOLO, M. Volatile fraction of milk: comparison between purge and trap and solid phase microextraction techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7350-7355, 2002.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of whey and probiotic bacteria on the properties of fermented lactic beverages. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 23-33, 2009.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

FERNANDEZ-GARCIA, E.; MCGREGOR, J. U. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2934–2939, 1994.

GALLARDO-ESCAMILLA, F. J.; KELLY, A. L.; DELAHUNTY, C. M. Influence of starter culture on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and produced from fermented milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3745-3753, 2005.

IMHOF, R.; GLATTLI, H.; BOSSET, J. O. Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 27, p. 442-449, 1994.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v. 39, p. 1221-1227, 2006.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Application of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.

KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R. L.; VALDUGA, E.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 170-177, 2008.

KNEIFEL, W. M.; ULBERTH, F.; ERHARD, F.; JAROS, D. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. I. Screening of commercially available starter cultures. **Milchwissenschaft**, v. 47, p. 362-365, 1992.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in yogurt using two step fermentation and neutralised mix. **Food Australia**, v. 8, p. 363-366, 1997.

MONNET, C.; CORRIEU, G. Selection and properties of [alpha]-acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. **Food Microbiology**, v. 24, p. 601-606, 2007.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Off-flavors of whey protein concentrates: a literature review. **International Dairy Journal**, v. 1, p. 1-1, 1990.

OTT, A.; FAY, L. B.; CHAINTREAU, A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yoghurt flavor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 850-858, 1997.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; ALAKOMI, H.; SIGVARTMATTILA, P.; MÄTTO, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477-1482, 2006.

SERRA, M.; TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk, **International Dairy Journal**, v. 19, p. 100-106, 2009.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 393-400, 2005.

TSAU, J. L.; GUFFANTI, A. A.; MONTVILLE, T. J. Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 991-994, 1992.

VAZQUEZ-LANDAUVERDE, P. A.; VELAZQUEZ, G.; TORRES, A.; QLAN, M. C. Quantitative determination of thermally derived off-flavor compounds in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3764-3772, 2005.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

WERCINSKI, S. A. S.; PAWLISZYN, J. SPME. Theory. Pages 1-24 in *Solid phase microextraction: A practical guide*. S. A. S. Wercinski, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1999.

WRIGHT, B. J.; ZEVCHAK, S. E.; WRIGHT, J. M.; DRAKE, M. A. The impact of agglomeration and storage on flavor and flavor stability of whey protein concentrate 80% and whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 74, S17-S29, 2008.

XU, S.; BOYSLTON, T. D.; GLATZ, B. A. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9064-9072, 2005.

YANG, X. P.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 1925-1930, 1994.

ZHANG, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 844-853, 1994.

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J. P.; DESMAZEAUD, M. J. Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. *A review*. **Lait**, v. 72, p. 1-34, 1992.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE IOGURTES DURANTE O ARMAZENAMENTO UTILIZANDO CURVAS-MESTRE

Resultados preliminares deste trabalho foram apresentados na forma de resumo no *IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL)*, Florianópolis – SC, setembro de 2010 (Anexo D).

AValiação DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE IOGURTES DURANTE O ARMAZENAMENTO UTILIZANDO CURVAS-MESTRE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento reológico dos iogurtes elaborados: controle e probiótico, em diferentes temperaturas durante 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 ± 1 °C e avaliar a contagem de células viáveis no iogurte probiótico durante mesmo período. Os iogurtes foram elaborados com cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium* BB-12. O comportamento reológico foi descrito pelo modelo Lei da Potência utilizando a técnica da curva-mestre. A curva-mestre foi construída através do uso de uma temperatura e tensão de cisalhamento de referência, 6 °C e 2,5 (Pa), respectivamente e da determinação de um fator de deslocamento (a_T). O comportamento tixotrópico foi avaliado calculando a área de histerese entre as curvas de fluxo ascendente e descendente. O iogurte probiótico apresentou contagens da bifidobactéria superiores a 10^6 UFC/mL durante o armazenamento. Quanto às propriedades de fluxo o modelo lei da Potência foi considerado apropriado ($R > 0,98$). Ambos os iogurtes apresentaram características de fluido Não-Newtoniano, no entanto, o iogurte controle tendência do comportamento dilatante ($n > 1$) e o probiótico predomínio do comportamento *shear thinning* ($n < 1$). A histerese dos iogurtes foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas temperaturas mais baixas avaliadas. A curva-mestre foi considerada útil na avaliação do comportamento reológico dos iogurtes nas diferentes faixas de temperatura, tensão e taxa de cisalhamento avaliadas, podendo-se observar que tal comportamento permaneceu semelhante.

Palavras-chave: Iogurte probiótico, reologia, *Bifidobacterium* BB-12, lei da Potência, curva-mestre

EVALUATION OF RHEOLOGICAL BEHAVIOUR OF YOGURT DURING STORAGE USING MASTER CURVE

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the rheological behaviour of yogurt elaborated: control and probiotic at different temperatures during 28 days of refrigerated storage at 4 ± 1 °C and evaluate the viable cell count in probiotic yogurt for the same period. The yogurts were elaborated with strains of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* and *Bifidobacterium* BB-12. The rheological behaviour was described by the Power Law model using the master-curve technique. The master curve was constructed with a temperature and shear stress of reference, 6 °C and 2.5 (Pa), respectively, and of determining a shift factor (a_T). The thixotropic behaviour of the samples was evaluated by calculating the hysteresis loop area between the upward and downward flow curves. The probiotic yogurt showed counts of bifidobacteria higher than 10^6 CFU/mL during storage. As for the flow properties, the Power Law model was considered appropriate ($R > 0.98$). Both yogurts were characterized as non-Newtonian fluid, however, the control yogurt trend of dilatant behaviour ($n > 1$) and probiotic dominance of shear thinning behaviour ($n < 1$). The hysteresis of yoghurt was significantly higher ($p < 0.05$) at the lowest temperatures studied. The master curve was found useful in assessing the rheological behaviour of yogurt in the different ranges of temperature, shear stress and rate appreciated and can be observed that such behavior remained similar.

Keywords: Probiotic yogurt; rheology; *Bifidobacterium* BB-12; Power Law; Master curve.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a indústria de laticínios tem se renovado através da busca por produtos caracterizados não somente pelo seu valor nutricional e sabor agradável, mas também pela sua habilidade em exercer efeitos terapêuticos à saúde do consumidor (CASIRAGHI et al., 2007). Neste contexto, os probióticos são os mais populares (RAVULA; SHAH, 1998) e os derivados lácteos são amplamente utilizados como veículos de incorporação destes produtos.

As bactérias clássicas na produção de iogurte (*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) não resistem às condições adversas do trato digestivo e são incapazes de colonizar o intestino humano. Ao contrário, as culturas probióticas, fornecem efeitos terapêuticos ao homem ao se fixarem na parede do cólon. Para isso precisam estar viáveis no alimento durante toda a vida-de-prateleira e serem ingeridas com frequência (SCHREZENMEIR; DE VERSE, 2001). Alguns dos microrganismos mais utilizados para elaboração de iogurtes probióticos são o *Lactobacillus acidophilus* e o *Bifidobacterium* ssp. (GOMES; MALCATA, 1999; LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003).

A formação do gel é uma das principais características para a obtenção do iogurte. O uso de diferentes tipos de cultivos bacterianos iniciadores (AFONSO; MAIA, 1999; LIN et al., 2006), a adição de soro (LUCEY; MUNRO; SINGH, 1999), a composição do leite (AFONSO; MAIA, 1999), o processamento (AICHINGER et al., 2003), incluindo as etapas pós-fermentação, como por exemplo, a quebra do coágulo e a temperatura de armazenagem (KEOGH; O'KENNEDY, 1998; AFONSO; MAIA, 1999), poderiam modificar as propriedades químicas, microbiológicas e reológicas de iogurtes.

Na avaliação da qualidade de vários produtos lácteos, considerável importância é dada às propriedades de consistência e textura do produto, uma vez que estas influenciam na aceitabilidade pelo consumidor (AWADHWAL; SING, 1985). A avaliação da estabilidade de um produto ou de sua estrutura durante a produção ou armazenamento é descrita pela reologia. O conhecimento das propriedades reológicas torna-se necessário para uma série de aplicações como: efetuar um controle de qualidade das matérias-primas isoladamente ou de produtos finais (KOKINI, 1992), estudar a influência de componentes da formulação nas características reológicas e o próprio efeito da temperatura de produção em sua estrutura, além do

controle e dimensionamento de processos industriais (VASQUES, 2003; CHUAH et al., 2007).

No estudo da reologia de produtos lácteos, o modelo da lei da Potência é frequentemente aplicado para descrever as propriedades de fluxo de iogurtes (ABU-JDAYIL; MOHAMEED, 2002), iogurtes elaborados a partir de leite e soro concentrados por ultrafiltração (MAGENIS et al., 2006), iogurtes fortificados (APORTELA-PALACIOS; SOSA-MORALES; VÉLEZ-RUIZ, 2005), bebidas lácteas (PENNA; SIVIERI; OLIVEIRA, 2001) entre outros.

Frente ao exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento reológico dos iogurtes controle e probiótico, nas diferentes temperaturas durante nos 28 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C, utilizando a técnica da curva-mestre e monitorar a viabilidade das células probióticas do iogurte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para a elaboração dos iogurtes foi utilizado leite pasteurizado comercial (3,00 % de gordura), cultura termofílica (YCX-11[®], Chr. Hansen, Honsholm, Denmark) contendo *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* e cultura probiótica composta de *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12[®], Chr. Hansen, Honsholm, Denmark). Para a realização das análises microbiológicas foi utilizado ágar MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, Merck, Darmstadt, Germany), cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), propionato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e Anaeroen[®] (Oxoid, Hampshire, UK). Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico.

2.2 ELABORAÇÃO DOS IOGURTES

Os iogurtes (controle e probiótico) foram elaborados de acordo com método proposto por Almeida et al. (2001) com algumas modificações. O leite (1 L) foi aquecido até atingir a temperatura de 40 ± 1 °C e então inoculado com a cultura termofílica, no entanto, o iogurte probiótico também foi adicionado da cultura contendo *Bifidobacterium* BB-12. As duas culturas foram adicionadas nas seguintes concentrações: 0,0032% (m/v) e 0,0200% (m/v), respectivamente. Os iogurtes foram

fermentados a temperatura de 40 ± 1 °C até alcançar pH 4,6 e imediatamente resfriados a 4 ± 1 °C. Após o resfriamento e repouso, os iogurtes foram levemente batidos e colocados em potes plásticos, selados com tampa de alumínio e armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) até a realização das análises microbiológicas e reológicas nos dias 1 e 28 de armazenamento.

2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A contagem da *Bifidobacterium* foi realizada no iogurte probiótico de acordo com metodologia proposta por Vinderola e Reinheimer (2000), através do plaqueamento em superfície utilizando ágar MRS modificado com adição de 0,2 % (m/v) de cloreto de lítio e 0,3 % (m/v) de propionato de sódio (LP-MRS). As placas foram incubadas em anaerobiose (Anaerogen®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) por 72 horas a 37 ± 1 °C. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células probióticas viáveis, e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia por mL de iogurte (UFC/mL). As análises foram realizadas em duplicata.

2.4 ANÁLISES REOLÓGICAS

As medidas reológicas dos iogurtes foram realizadas em um reômetro rotacional (Brookfield Engineering, Laboratories, modelo DVIII Ultra, Stoughton, MA, USA), com cilindros concêntricos (spindle SC4-27) à temperatura controlada de $4,0 \pm 0,1$ °C, através de um banho de água circulante (Tecnal modelo TE-184, SP, Brasil). A obtenção dos dados foi feita no software Rheocalc® 32 (versão 2.5, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA). As curvas de fluxo foram geradas medindo a tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação (0,72 a 18, 70 s⁻¹). O comportamento de fluxo foi descrito pelo modelo Lei da Potência ($\sigma = K\gamma^n$) onde σ é a tensão de cisalhamento (Pa), γ é a taxa de deformação (s⁻¹), enquanto que K e n são o índice de consistência (Pa.sⁿ) e o índice de comportamento de fluxo, respectivamente. O comportamento tixotrópico das amostras foi avaliado calculando a área de histerese entre as curvas de fluxo ascendente e descendente.

Os valores da energia de ativação (E_a) foram determinados pela equação de Arrhenius ($K = K_T e^{\frac{E_a}{RT}}$), onde K é o índice de consistência

(Pa.sⁿ) e K_T é o fator pré-exponencial. Para determinação da tixotropia e energia de ativação, as medidas foram realizadas à temperatura controlada de 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 ± 0,1 °C, também através do banho de água circulante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O comportamento reológico dos iogurtes nas quatro temperaturas foi ainda interpretado através do uso de curvas-mestre que permitem uma previsão do comportamento reológico do fluido em toda a faixa de temperatura, taxa e tensão de cisalhamento em estudo. A curva-mestre

foi elaborada através da equação $\sigma = f(T, \dot{\gamma}) = K_0 e^{\frac{Ea}{RT}} (\dot{\gamma})^n$, utilizando uma temperatura de referência de 6 °C, tensão de cisalhamento de 2,5 Pa e determinação de um fator de deslocamento horizontal dos dados (a_T), de acordo com Chin et al. (2009).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita no *software* Statistica 6.0 (Statsoft 1984-2001, Tulsa, OK, USA). Foi utilizada a análise de variância ANOVA a fim de encontrar diferenças significativas entre as médias, com um nível de significância de 5%. Quando foram encontradas diferenças significativas entre as amostras, as médias foram comparadas através do teste de Tuckey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O iogurte probiótico apresentou contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* de 8,9 x 10⁷ UFC/mL e 7,0 x 10⁷ UFC/mL nos dias 1 e 28, respectivamente. Os resultados da viabilidade da bifidobactéria demonstram que o iogurte foi considerado probiótico, uma vez que demonstrou contagem total da bactéria superior a 10⁶ UFC/mL. De acordo com Shah (2000) bactérias probióticas devem permanecer viáveis e em concentração de no mínimo 10⁶ UFC/mL para exercer seus efeitos terapêuticos. No entanto, Chen e Walker (2005) afirmam que o melhor método de administração de probióticos é a ingestão contínua, para garantir a presença destes microrganismos em grande número no intestino a fim de proporcionar os efeitos desejados.

Resultados similares aos obtidos de sobrevivência de *Bifidobacterium* foram descritos na literatura por Shin et al. (2000) que relatam contagens acima de 10^6 UFC/mL durante a vida de prateleira de iogurtes probióticos. Já Fritzen-Freire et al. (2010) ao avaliarem a estabilidade da bifidobactéria em queijos minas frescal observaram altas contagens durante o período de armazenamento de seus produtos. Por fim, Mc Brearty et al. (2001) estudando a viabilidade de *Bifidobacterim* BB-12 em queijo Cheddar observaram que a bactéria resistiu às condições ambientais por seis meses de maturação, apresentando contagens acima de 10^6 UFC/g durante todo este período.

3.2 MEDIDAS REOLÓGICAS

Os valores dos parâmetros reológicos do modelo Lei da Potência, ajustados as curvas de tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação para cada temperatura estudada, bem como os coeficientes de correlação (R) avaliados durante os 28 dias de armazenamento encontram-se na Tabela 1. O modelo ajustou-se adequadamente aos dados da curva de tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação para todas as amostras ($R > 0,98$), ou seja, o modelo foi considerado apropriado, pois conseguiu descrever o comportamento reológico do iogurte probiótico.

Tabela 1. Parâmetros reológicos obtidos utilizando o modelo Lei da Potência ($\sigma = K\gamma^n$) para o iogurte controle e probiótico nas temperaturas 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 \pm 0,1 °C, nos dias 1 e 28 de armazenamento.

Amostra	Temperatura (°C)	Dias	K* (Pa s ⁿ)	n**	R***
Controle	2	1	0,368 ^{A,a}	0,976 ^{A,a}	0,9994
		28	0,113 ^{A,b}	1,183 ^{A,b}	0,9980
	4	1	0,332 ^{A,a}	0,975 ^{A,a}	0,9958
		28	0,102 ^{A,b}	1,139 ^{A,a}	0,9974
	6	1	0,134 ^{A,a}	1,108 ^{A,a}	0,9961
		28	0,101 ^{A,b}	1,067 ^{A,a}	0,9928
	8	1	0,100 ^{A,a}	1,111 ^{A,a}	0,9933
		28	0,141 ^{A,b}	0,854 ^{A,b}	0,9882
Probiótico	2	1	0,265 ^{B,a}	1,083 ^{B,a}	0,9995
		28	0,205 ^{B,a}	0,999 ^{B,b}	0,9957
	4	1	0,208 ^{B,a}	1,105 ^{B,a}	0,9997
		28	0,182 ^{A,a}	0,976 ^{A,b}	0,9939
	6	1	0,156 ^{A,a}	1,130 ^{A,a}	0,9982
		28	0,146 ^{B,a}	0,978 ^{A,a}	0,9919
	8	1	0,166 ^{B,a}	0,987 ^{B,a}	0,9927
		28	0,165 ^{A,a}	0,840 ^{A,b}	0,9900

* Índice de consistência (K).

** Índice de comportamento de fluxo (n).

*** Coeficiente de correlação (R).

^{A,B} - Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna, indicam diferença (nível de significância de 5%) entre as amostras no mesmo dia de armazenamento e na mesma temperatura

^{a,b} - Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna, indicam diferença significativa (nível de significância de 5 %) entre os dias de armazenamento para mesma amostra e temperatura.

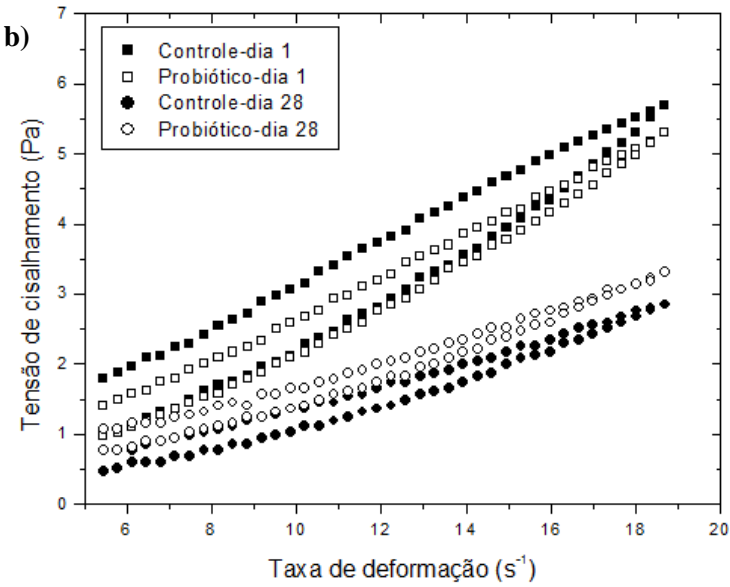
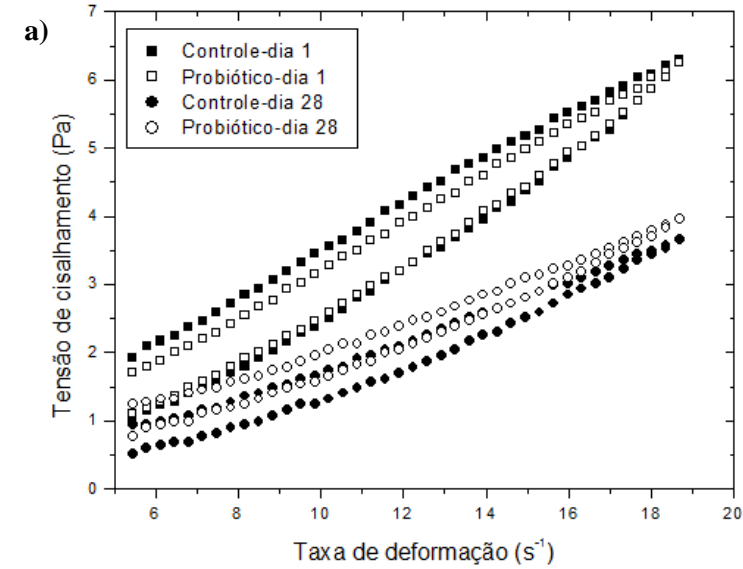
Para diferentes tempos e/ou temperaturas de armazenamento Penna, Sivieri e Oliveira (2001), Lubbers et al. (2004), Castro et al. (2008), Cunha et al. (2009) e Debon, Prudêncio e Petrus (2010) também utilizaram este modelo com sucesso em leites fermentados.

Quando comparados os parâmetros de ajuste da Lei da Potência (Tabela 1) dos iogurtes no mesmo dia de armazenamento, pôde-se

observar que com o aumento da temperatura o índice de consistência (K) apresentou uma tendência à diminuição, enquanto o índice de comportamento do fluido (n) aumentou, demonstrando desta forma que ambos os iogurtes apresentaram características de fluido não-Newtoniano. No entanto, o iogurte controle apresentou uma tendência ao comportamento dilatante ($n > 1$) e o probiótico um predomínio do comportamento *shear thinning* ($n < 1$). Diferenças no comportamento reológico de leites fermentados, caracterizando-os como dilatante ou *shear-thinning*, foram também determinadas por Penna, Sivieri e Oliveira (2001).

Para o mesmo iogurte e mesma temperatura entre diferentes dias de armazenamento, foi verificada mudanças no comportamento do fluido. Segundo Kailasapathy (2006) e Marafon et al. (2010) estas mudanças reológicas nos iogurtes podem ter ocorrido devido à acidificação durante o armazenamento sob refrigeração. Kailasapathy (2006) afirma que a pós-acidificação de leites fermentados é decorrente da manutenção da β -galactosidase em atividade na temperatura de refrigeração. Por outro lado, Marafon et al. (2010) relatam que a acidificação de um iogurte batido reforça a rede protéica. Sodini et al. (2005) relatam que essas diferenças poderiam estar associadas ao tempo de fermentação empregados na obtenção dos iogurtes, que permitiria um grande número de ligações protéicas durante o primeiro estágio de coagulação. Tal fato poderia gerar um grande estresse na rede durante o segundo estágio de coagulação, fase de agregação das caseínas, resultando em menores quantidades de caseínas agregadas e conseqüentemente em um gel menos firme, influenciando nas propriedades reológicas do produto. Tison et al. (1982) citam que o *S. thermophilus*, microrganismo empregado na elaboração dos iogurtes, é capaz de produzir metabólitos básicos da uréia a baixas temperaturas que podem também contribuir na produção de um iogurte mais ácido durante o armazenamento.

Na Figura 1 (a-d), podem-se visualizar os reogramas dos iogurtes (controle e probiótico), nas diferentes temperaturas avaliadas, onde se verificou que as curvas não apresentaram uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, apresentando assim, o fenômeno da histerese, indicando que são dependentes do tempo de armazenamento, confirmando também o comportamento de fluido não-Newtoniano.



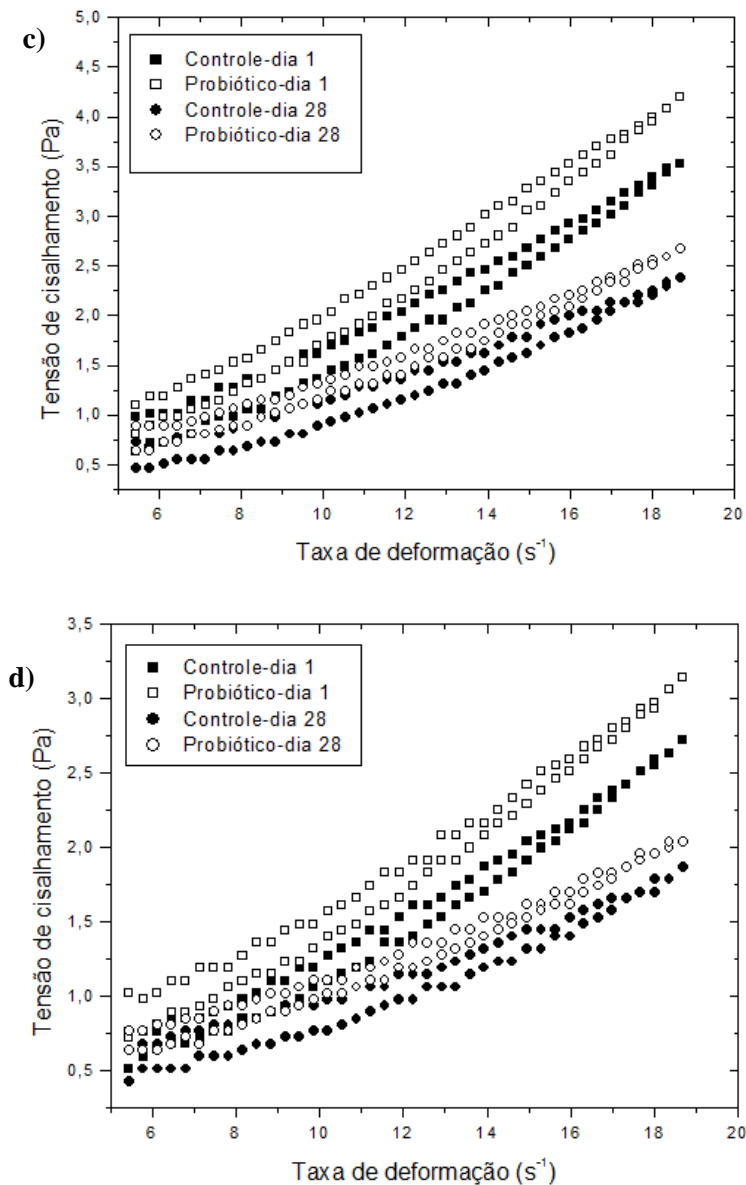


Figura 1. Representação gráfica das curvas de fluxo, tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação para os iogurtes controle e probiótico nos dias 1 e 28 de armazenamento a $2 \pm 0,1$ °C (a), $4 \pm 0,1$ °C (b), $6 \pm 0,1$ °C (c) e $8 \pm 0,1$ °C (d).

De acordo com Benezech e Maingonnat (1994) e Penna et al. (2001), a principal característica da relação tensão de cisalhamento/taxa de cisalhamento é o desenvolvimento da curva de histerese, quanto maior a área abaixo da curva, maior será o efeito tixotrópico. Gambusí, Gumul & Juszczak (2004) relatam que a tixotropia é um fenômeno comumente detectado em aglomerados de partículas frágeis, como os de leites fermentados, que ocorre quando estes são submetidos a uma força de cisalhamento. Neste caso, a estrutura tridimensional inicialmente formada no processo de fermentação, se desfaz, no entanto pode ser parcialmente revertida, após um período de repouso. Segundo Teo, Munro e Singh (2000) a tixotropia de iogurtes poderia ser atribuída à quebra das partículas ou a ruptura das ligações dissulfeto, Van der Waals, iônicas e interações hidrofóbicas entre as partículas de proteínas do soro. Já, Magenis et al. (2006) relatam que a quebra da rede de partículas e a quebra de ligações fracas entre partículas também podem causar a tixotropia em iogurtes. Shaker, Jumah e Abu-Jdayil (2000) afirmam que a maioria dessas forças são fracas e podem ser rompidas pela energia do fluxo de cisalhamento.

Pode-se observar na Figura 2 que nas temperaturas de 2 °C e 4 °C a histerese dos iogurtes foram afetadas significativamente ($p < 0,05$) pelo tempo de armazenamento, enquanto que nas maiores temperaturas avaliadas, 6 °C e 8 °C, não foram observadas diferenças. Também nas temperaturas mais baixas (2 °C e 4 °C) foi observado diminuição ($p < 0,05$) da área de histerese entre as amostras. Desta forma, menor energia é requerida para destruir a estrutura do gel. Temperaturas mais elevadas durante o armazenamento contribuíram para a obtenção de iogurtes (controle e probiótico) com estruturas mais estáveis. Tal fato poderia também estar associado ao grande estresse na rede protéica durante o segundo estágio de coagulação, gerando um gel menos firme. O mesmo comportamento foi observado também em iogurtes contendo bifidobactéria por Ramchandran e Shah (2010).

Assumindo que a área de histerese é um índice da energia necessária para destruir a estrutura responsável pela tempo-dependência (TÁRREGA, DURÁN, COSTELL, 2004), durante os 28 dias de armazenamento a temperatura teve um efeito significativo sobre a histerese dos iogurtes elaborados à baixas temperaturas, observando a diminuição da mesma, e tal fato poderia estar relacionado à uma redução da viscosidade.

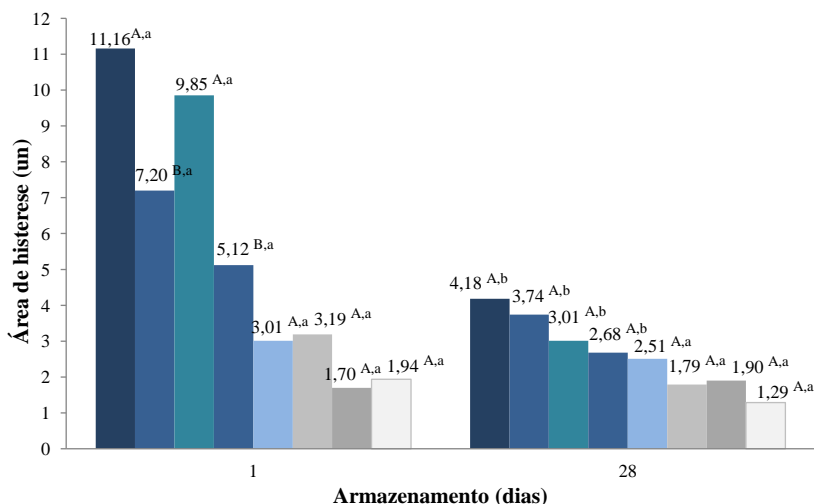


Figura 2. Área de histerese dos iogurtes (Controle-C e Probiótico-P) (■) C $2 \pm 0,1$ °C, (■) P $2 \pm 0,1$ °C, (■) C $4 \pm 0,1$ °C, (■) P $4 \pm 0,1$ °C, (■) C $6 \pm 0,1$ °C, (■) P $6 \pm 0,1$ °C, (■) C $8 \pm 0,1$ °C e (■) P $8 \pm 0,1$ °C nos dias 1 e 28 de armazenamento.

^{A,B} - Valores seguidos de letras diferentes entre as barras, indicam diferença (nível de significância de 5%) entre as amostras no mesmo dia de armazenamento e na mesma temperatura

^{a,b} - Valores seguidos de letras diferentes entre conjunto de barras, indicam diferença significativa (nível de significância de 5 %) entre os dias de armazenamento para mesma amostra e temperatura.

Com a temperatura de 6 °C e tensão de cisalhamento de 2,5 (Pa) como referência cada curva-mestre foi desenvolvida através da determinação de um fator de deslocamento (a_T). A Figura 3 mostra as curvas-mestre dos iogurtes controle e probiótico, onde conseguimos obter uma visão geral do comportamento reológico destes iogurtes, assim, no eixo y temos a tensão de cisalhamento original enquanto no eixo x, a divisão da taxa de deformação pelo fator de deslocamento (a_T), a qual conduziu a sobreposição linear dos dados em uma única linha. Com esta sobreposição pode-se considerar que nas faixas de temperaturas avaliadas, o comportamento reológico dos iogurtes permaneceu semelhante, pois apresentaram o mesmo comportamento ou o mesmo perfil reológico. Através da linearização do modelo de Arrhenius, obtiveram-se os valores da energia de ativação (E_a) das amostras, que é utilizada para avaliar o efeito da temperatura sobre os

parâmetros reológicos. Os valores da energia de ativação foram iguais a 155302 J/mol e 57336 J/mol para as amostras do iogurte controle e probiótico, respectivamente.

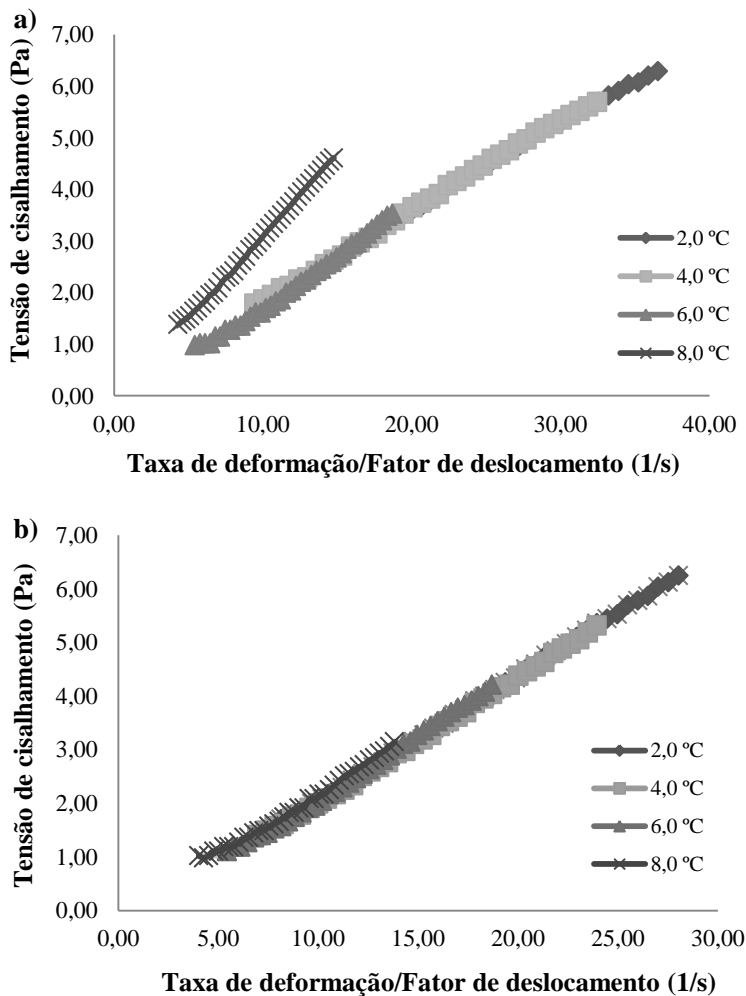


Figura 3. Curvas-mestre a temperatura de referência de 6 °C mostrando a variação da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação dividida pelo fator de deslocamento (a_T) para o iogurte controle (a) e probiótico (b) nas temperaturas de 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 °C no dia 1 de armazenamento.

Verifica-se a partir da Figura 3 que a temperatura teve maior influência no comportamento reológico da amostra de iogurte controle, pois na temperatura de 8 °C não houve a sobreposição linear dos dados o que pôde ser comprovado pelo maior valor de Ea da amostra.

As Equações 1 e 2 descrevem o comportamento reológico das amostras de iogurte controle e probiótico, respectivamente, nas diferentes faixas de temperatura, tensão e taxa de cisalhamento avaliadas.

$$\text{Eq. 1} \quad \sigma = 1,37 \cdot 10^{-30} e^{\frac{6896,1}{T}} \dot{\gamma}^{1,04}$$

$$\text{Eq. 2} \quad \sigma = 3,26 \cdot 10^{-12} e^{\frac{6896,1}{T}} \dot{\gamma}^{1,07}$$

4. CONCLUSÃO

O período de armazenamento dos iogurtes não influenciou na contagem de células viáveis do iogurte probiótico. Em relação aos parâmetros reológicos, os iogurtes demonstraram comportamento de um fluido não-Newtoniano, sendo que o iogurte controle apresentou uma tendência à dilatação enquanto o probiótico predominou o comportamento *shear-thinning*. O fenômeno da tixotropia esteve presente tanto no iogurte controle quanto no probiótico, porém em menor intensidade nas amostras de iogurte avaliadas nas temperaturas mais elevadas. A técnica da curva-mestre foi considerada útil para demonstrar o comportamento reológico dos iogurtes em toda a faixa de temperaturas, taxa e tensão de cisalhamento em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-JDAYIL, B.; MOHAMEED, H. Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 52, n. 4, p. 359-365, 2002.
- AFONSO, I. M.; MAIA, J. M. Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. **Journal of Food Engineering**. v. 42, n. 4, p. 183-190, 1999.
- ALMEIDA, K. E. de; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. de O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 7-13, 2000.
- APORTELA-PALACIOS, A.; SOSA-MORALES, M. E.; VÉLEZ-RUIZ, J. F. Rheological and physicochemical behavior of fortified yoghurt, with fiber and calcium. **Journal of Texture Studies**, v. 36, p. 333-349, 2005.
- AWADHWAL, N. K.; SINGH, C. P. A rheological model for milk products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1611-1614, 1985.
- BENEZECH, T.; MAINGONNAT, J. F. Characterization of rheological properties of yoghurt-a review. **Journal of Food Engineering**, v. 21, p. 447-472, 1994.
- CASIRAGHI, M.C.; CANZI, E.; ZANCHI, R.; DONATI, E.; VILLA, L. Effects of a symbiotic milk product on human intestinal Ecosystem. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 499-506, 2007.
- CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; BARRETO, P. M.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, 2008.
- CHEN, C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in Pediatrics**, Denver, v. 52, p. 77-113, 2005.

CHIN, N. L.; CHAN, S. M.; YUSOF, Y. A.; CHUAH, T. G.; TALIB, R. A. Modeling of rheological behavior of pummel juice concentrates using master-curve. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 134-140, 2009.

CHUAH, T. G.; NISAH, H. H.; CHOONG, S. Y. T.; CHIN, N. L.; SHEIKH, N. Effects of temperature on viscosity of dodol (concoction). **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 423-430, 2007.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. M.; CASTRO, F. P.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of whey and probiotic bacteria on the properties of fermented milk beverages. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 23-33, 2009.

DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E. S.; PETRUS, J. C. C. Rheological and physico-chemical characterization of prebiotic microfiltered fermented milk. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 128-135, 2010.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Baillière Tindall, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 561-568, 2010.

GAMBUS', H.; GUMUL, D.; JUSZCAZK, L. Rheological properties of pastes obtained from starches derived from immature cereal kernel. **Starch/Stärke**, 56, 225-231, 2004.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KEOGH, M. K.; O' KENNEDY, B. T. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 1, p. 108-112, 1998.

KOKINI, J. L. Rheological properties of foods. In D. R. Heldman, & D. B. Lund, Handbook of food engineering (p. 38). Marcel Dekker, New York, 1992.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

LUBBERS, S.; DECORCELLE, N.; VALLET, N.; GUICHARD, E. Flavor release and rheology behavior of strawberry fat free stirred yogurt during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3077-3082, 2004.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Effects of heat properties and structure of acid skim milk gels. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 3, p. 275- 279, 1999.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; CERQUEIRA JÚNIOR, N. G.; OLIVEIRA, R. V. B.; SOLDI, V.; BENEDET, H. D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 560-568, 2006.

MARAFON, A. P.; SUMI, A.; ALCÂNTARA, M. R.; TAMINE, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Optimization of the rheological properties of probiotic yogurts supplemented with milk proteins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 511-519, 2011.

MC BREARTY, S.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; WALLACE, J. M.; STANTON C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **International Dairy Journal**, v.11, p.599-610, 2001.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 49, n.1, p. 7-13, 2001.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 7-13, 2001.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 819-827, 2010.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 819–822, 1998.

SCHREZENMEIR, J.; DE VERSE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics- approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, suppl., p. 361s-364s, 2001.

SHAH, N.P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acid production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, v.55, n.3, p.127-131, 2000.

SHAKER, R. R.; JUMAH, R. Y.; ABU-JDAYIL, B. Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 44, n. 3, p. 175-180, 2000.

SHIN, H. S.; LEE, J. H.; PESTKA, J. J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* ssp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 884–887, 2000.

SODINI, I.; LUCAS, A.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2005.

TÁRREGA, A.; DURÁN, L.; COSTELL, E. Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 345–353, 2004.

TEO, C. T.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Time dependence of rheological breakdown and recovery of heat precipitated whey protein suspensions. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 55, p. 29-32, 2000.

VASQUES, C. T. **Reologia do suco de goiaba**: efeito da diluição e do tamanho de partícula. Florianópolis, 2003. 66p. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O iogurte elaborado foi considerado probiótico, pois apresentou quantidade de células viáveis acima de 10^6 UFC/ml logo após a sua elaboração e também durante o, armazenamento refrigerado por 28 dias.

Através da metodologia de superfície de resposta obtive-se como condições ótimas para a extração de compostos voláteis das amostras de iogurte: a temperatura de 50 °C e 5 g de adição de NaCl. A otimização resultou na identificação de cinco compostos voláteis que são caracterizados como compostos chave na identificação de iogurtes, sendo eles: 2-butanona, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, acetona e ácido hexanóico. A composição volátil das amostras de iogurtes permaneceu estável durante os 28 dias de armazenamento, e 2-butanona, 2,3-butanodiona e acetona foram os compostos encontrados em maior quantidade no iogurte probiótico. A técnica de SPME acoplada à GC-MS mostrou-se como uma ótima alternativa na extração, identificação e quantificação de compostos voláteis em amostras de iogurte.

Os iogurtes demonstraram um comportamento reológico de fluido não-Newtoniano, sendo que o iogurte controle apresentou uma tendência à dilatância enquanto o probiótico predominou do comportamento *shear-thinning*. Estas mudanças podem ter ocorrido devido ao longo período de fermentação comum de leites fermentados, ou ainda, devido à acidificação verificada durante o armazenamento.

Com a técnica das curvas mestre pôde-se observar que o comportamento reológico dos iogurtes permaneceu semelhante nas diferentes temperaturas, tensão e taxa de cisalhamento avaliadas.

Estudos futuros para avaliar e quantificar o perfil de derivados lácteos elaborados com diferentes cepas de culturas *starters* e/ou probióticas, poderão servir para a melhoria do aroma e sabor destes produtos. É importante ressaltar que a qualidade do aroma de um iogurte depende de muitos fatores e, portanto, mais estudos são necessários para avaliar o impacto da adição de diferentes componentes no aroma final dos produtos.

ANEXOS

**ANEXO A – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo
no *SIMCRO - Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins*,
Campos do Jordão, São Paulo, Brasil, 14 a 16 de setembro de 2010**

Certificação

Certificamos que o trabalho OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR HS-SPME/GCMS DE IOGURTE PROBIÓTICO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA de TANELLO, A. C.; SILVEIRA, C. D. S.; CARASEK, E.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. foi apresentado durante o SIMCRO 2010, realizado de 14 a 16 de Setembro de 2010 em Campos do Jordão (SP).


Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças
Presidente



Instituto Internacional
de Cromatografia

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR HS-SPME/GCMS DE IOGURTE PROBIÓTICO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Ana C. Tanello¹, Cristine D. de Souza Silveira², Eduardo Carasek²,
Elane S. Prudêncio¹, Renata D. M. Castanho Amboni¹

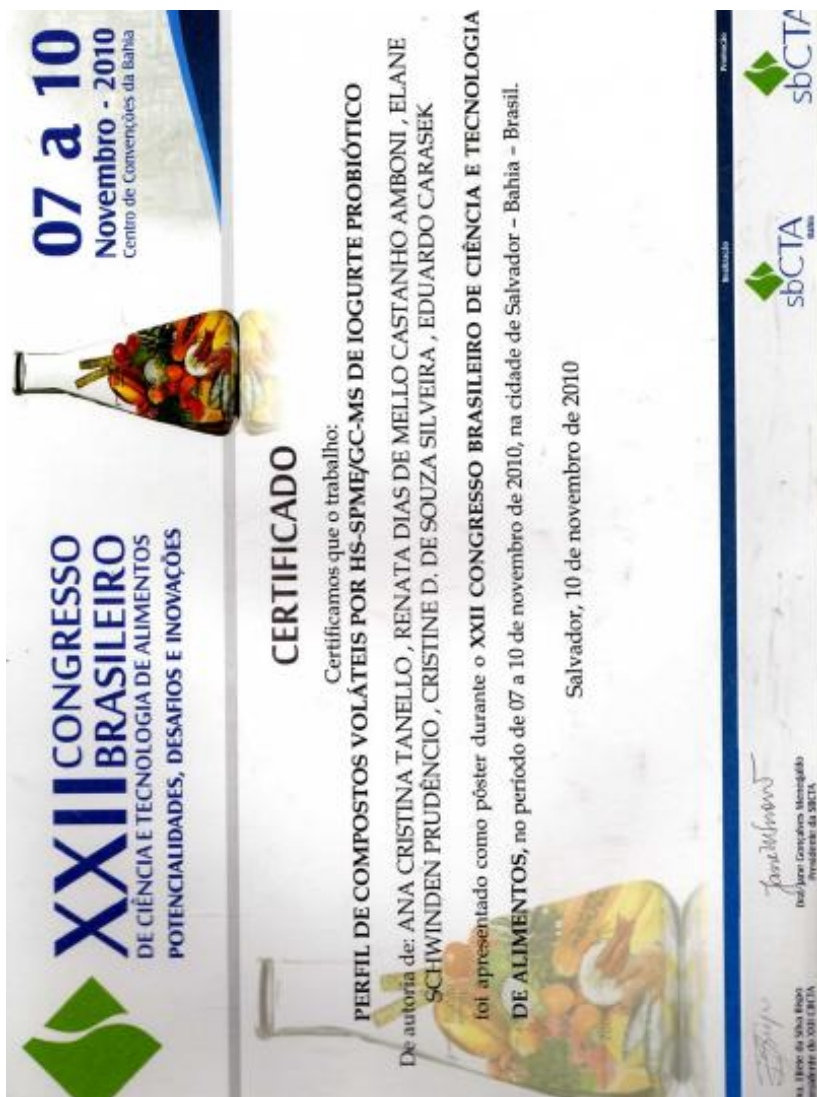
¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, ²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 – Florianópolis-SC, Brasil
e-mail: aninhatanello@gmail.com

Iogurte é o produto resultante da fermentação do leite com cultivos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*. Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são empregadas como probióticos em derivados lácteos. Para a fabricação do iogurte foi utilizado leite pasteurizado, cultura láctica termofílica composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e cultura probiótica contendo *Bifidobacterium* BB-12. Este trabalho tem como objetivo aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para a otimização das condições de extração dos compostos voláteis do iogurte probiótico através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS), a fim de se obter as melhores condições na extração dos compostos voláteis. Foi desenvolvido um Delineamento Composto Central (CCD) com três variáveis independentes (temperatura de extração, tempo de extração e força iônica pela adição de cloreto de sódio). As temperaturas de extração variaram de 40 a 60 °C, o tempo de extração de 30 a 150 minutos e a massa de cloreto de sódio de 0 a 6 gramas. Utilizou-se um volume de 20 mL de amostras. A extração foi efetuada no modo *headspace* (HS) empregando fibra DVB/CAR/PDMS/ de 50 µm (Supelco), previamente selecionada. Como resposta (variável dependente) usou-se a média das áreas dos picos dos analitos observados no perfil cromatográfico, a fim de criar um compromisso de resposta para os compostos avaliados. A partir da análise dos resultados obtidos empregando o *software* STATISTICA 6.0 construiu-se as superfícies de resposta. Os coeficientes de regressão dos efeitos lineares, quadráticos e de interação foram determinados por Regressão Linear Múltipla (MLR). O teste *t*-Student foi usado para avaliar a significância

estatística. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo. Através da RSM observamos que os efeitos lineares e quadráticos da temperatura de extração e da força iônica foram significativos ($p < 0,05$), contudo o tempo de extração não teve influência significativa na extração dos compostos voláteis. Foi obtida a maximização da extração dos compostos voláteis, na temperatura de extração de 50 °C, com tempo de extração de 40 minutos e 3 g de cloreto de sódio. Nessa condição foram identificados os seguintes compostos: acetona, 2,3-butanodiona, ácido acético, 2,3-pentanodiona, 2-butanona, 2-heptanona e ácido hexanóico. Sendo que a 2,3-butanodiona, 2-butanona e o ácido hexanóico foram os compostos majoritários e geralmente são encontrados em bebidas lácteas e responsáveis pelo aroma característico de um iogurte. Os compostos foram tentativamente qualificados através da comparação dos espectros obtidos com os espectros da biblioteca NIST, com exceção dos compostos (acetona, ácido acético, 2,3-butanodiona, 2-butanona e ácido hexanóico) que também foram identificados através da injeção do padrão.

Agradecimentos: Os autores agradecem a UFSC, CAPES e CNPq.

**ANEXO B – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo
no *XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*,
Salvador, Bahia, Brasil, 07 a 10 de novembro de 2010.**





**XXII CONGRESSO
BRASILEIRO**
DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



07 a 10
Novembro - 2010
Centro de Convenções da Bahia
Salvador - Bahia - Brasil

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS:
POTENCIALIDADES, DESAFIOS E INOVAÇÕES

PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR HS-SPME/GC-MS DE IOGURTE PROBIÓTICO.

ANA CRISTINA TANELLO, RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI, ELANE SCHWINDEN PRUDÊNCIO, CRISTINE D. DE SOUZA SILVEIRA, EDUARDO CARASEK.

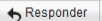
UFSC

O aroma de produtos lácteos fermentados, como o iogurte, é caracterizado por uma combinação de compostos voláteis conhecidos. No entanto, quando se tem modificações nas etapas de obtenção desses produtos, como, por exemplo, a adição de uma cultura probiótica, pode-se ter a formação de novos compostos voláteis que podem afetar a aceitabilidade destes produtos pelos consumidores. Ao contrário dos métodos clássicos de extração dos compostos voláteis, que consomem tempo, solventes e requerem exaustivos passos de concentração, a análise de compostos voláteis utilizando a microextração em fase sólida (SPME) acoplada à análise cromatográfica é uma técnica moderna, rápida e de fácil preparo de amostra. Dentro do contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar o perfil de compostos voláteis de iogurte probiótico através do uso da SPME e separação e identificação por GC-MS. Para a fabricação do iogurte foi utilizado leite pasteurizado, cultura láctica termofílica composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e cultura probiótica contendo *Bifidobacterium* BB-12. O iogurte foi fermentado a 40 ± 2 °C, embalados em copos plásticos e armazenados a 5 ± 1 °C até a realização das análises. A SPME foi utilizada para extração dos compostos voláteis, empregando o método por headspace e a fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano). Uma alíquota de 20 mL de iogurte e quantidade de sal, temperatura e tempo de extração de 3 gramas, 50 °C e 40 minutos respectivamente, foram empregados. Para separação e identificação dos compostos foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS). Foram identificados sete compostos voláteis no iogurte probiótico, dentre eles ácidos, ácidos graxos e cetonas: acetona, 2,3-butanodiona, ácido acético, 2,3-pentanodiona, 2-butanona, 2-heptanona e ácido hexanóico. Sendo que a 2,3-butanodiona, 2-butanona e o ácido hexanóico foram os componentes majoritários, estando estes compostos presentes também em outros tipos de leites fermentados, sendo provenientes das mudanças bioquímicas resultantes da fermentação e da degradação térmica. Os compostos foram tentativamente qualificados através da comparação dos espectros obtidos com os espectros da biblioteca NIST, com exceção dos compostos (acetona, ácido acético, 2,3-butanodiona, 2-butanona e ácido hexanóico), que também foram identificados através da injeção do padrão. Desta forma, a SPME/GC-MS mostrou ser eficiente na extração, separação e identificação dos compostos voláteis do iogurte probiótico.

Palavras-chave: *Bifidobacterium* BB-12, aroma, microextração em fase sólida, cromatografia gasosa.

ANEXO C – Artigo “Analysis of volatile compounds in probiotic yogurt during storage through solid-phase microextraction gas chromatography” submetido à publicação no *Journal of Food Science and Technology* (ISSN: 0975-8402)

International Journal of Food Science and Technology - Manuscript ID IJFST-2011-08388 Entrada X

☆ d.menzies@chester.ac.uk para elane, mim, ramboni, elane, carasek, renataamboni, og [mostrar detalhes](#) 25 mai 

25-May-2011

Dear Dr. Prudêncio:

Your manuscript entitled "Analysis of volatile compounds in probiotic yogurt during storage through solid-phase microextraction gas chromatography" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the International Journal of Food Science and Technology.

Your manuscript ID is IJFST-2011-08388.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijfst> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Corresponding Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ijfst>.

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Food Science and Technology.

Sincerely,
International Journal of Food Science and Technology Editorial Office

**ANEXO D – Parte do capítulo 2 apresentado na forma de resumo
no *IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL)*, 22 a 24 de
setembro, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2010.**



PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE IOGURTE PROBIÓTICO

Ana Cristina Tanello¹, Priscilla Nuernberg Rossa¹, Aureanna Nairne Negrão Murakami¹, Isabella Munoz², Elane Schwinden Prudêncio³, Renata Dias de Mello Castanho Amboni³.

¹ Pós-graduando em Ciência dos Alimentos (PGCAL/CCA/UFSC).

² Graduando do Curso de Ciência e Tecnologia Agroalimentar (CCA/UFSC).

³ Prof. Dr. do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL/CCA/UFSC). e-mail: aninhatanello@gmail.com

INTRODUÇÃO

Iogurte é o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (BRASIL, 2004), enquanto o probiótico, além dos cultivos fermentadores tradicionais, tem adição de culturas probióticas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LEE; SALMINEN, 1995).

Para o iogurte ser considerado probiótico a legislação brasileira fixa o limite mínimo de células viáveis probióticas em 10⁶ UFC/g ou mL (BRASIL, 2000). Porém, devido a sua baixa atividade proteolítica, as bactérias probióticas se desenvolvem lentamente no leite, sendo recomendada a adição de bactérias do iogurte na redução do tempo de fermentação. Neste caso, Scheinbach (1998) recomenda o uso de *Streptococcus thermophilus* em conjunto com as bifidobactérias.

Na avaliação da qualidade de vários produtos lácteos, considerável importância é dada às suas propriedades de consistência e textura, uma vez que estas influenciam em sua aceitabilidade pelos consumidores (AWADHAL; SINGH, 1985). A manutenção da estabilidade do produto ou sua estrutura durante a estocagem é descrita pela reologia, principalmente para emulsões e outras dispersões. Na ciência dos alimentos, a reologia é usada para o estudo da estrutura dos alimentos como resposta à aplicação de força ou deformação. Várias são as razões para se conhecer as propriedades reológicas dos alimentos, dentre elas efetuar o controle de qualidade de matérias-primas de processo ou fabricação de produtos finais, além de estudar a influência de componentes da formulação e relacionar a estrutura dos produtos com as suas características reológicas (STEFEE, 1996). Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar as propriedades reológicas de iogurte probiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a fabricação do iogurte foi utilizado leite pasteurizado padronizado, cultura lática termofílica YCX-11[®] (Chr. Hansen) composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e cultura probiótica contendo *Bifidobacterium* BB-12 (Bb-12[®], Chr. Hansen). A partir do leite pasteurizado aquecido a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ foram adicionadas na elaboração do iogurte a cultura láctea YCX-11[®] e a Bb-12. O iogurte foi fermentado a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ até pH em torno de 4,6, resfriados a $10 \pm 1^\circ\text{C}$, batidos lentamente, embalados em copos plásticos e armazenados a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. As medidas reológicas foram determinadas no 1º dia de armazenamento empregando-se reômetro rotacional (Brookfield Engineering Laboratories model DVIII Ultra) com cilindros concêntricos, *spindle* SC-27, e coletadas através do *software* Rheocalc[®] 32 (versão 2.5). As análises foram realizadas nas temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C, mantidas por circulação de água em banho com controle de temperatura. Todas as análises foram feitas em duplicata. As curvas de fluxo foram descritas pelo modelo da Lei da Potência.

A contagem de células viáveis probióticas foi determinada de acordo com Vinderola e Reinheimer (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O iogurte obtido foi considerado probiótico, pois apresentou contagens de células viáveis probióticas maiores do que 10^6 UFC/mL (BRASIL, 2000).

Os parâmetros reológicos das amostras descritos pelo modelo da Lei da Potência, nas temperaturas analisadas estão apresentados na Tabela 1. Os coeficientes de correlação para o modelo foram iguais a 0,99, sendo indicado para descrever o comportamento reológico do iogurte elaborado. Os reogramas do iogurte probiótico estão representados na Figura 1 (curva ascendente) e demonstram uma relação não linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação nas temperaturas de 2, 4, 6 e 8 °C, caracterizando este iogurte com comportamento não newtoniano. Este comportamento também foi verificado por outros pesquisadores (ABU-JDAYIL; MOHAMEED, 2002; CUNHA et al., 2008). Como esperado, os índices de consistência (K) foram menores para os iogurtes analisados nas temperaturas de 6 e 8 °C, isto é, o aumento da temperatura resultou no enfraquecimento da rede do gel do iogurte formada durante a fermentação.

Tabela 1. Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo da Lei de Potência ($\tau=K (\dot{\gamma})^n$) para os iogurtes nas temperaturas de 2, 4, 6 e 8°C.

Temperatura (°C)	Índice de consistência (K, Pa.s ⁿ)	R
2	0,265	0,99
4	0,208	0,99
6	0,154	0,99
8	0,165	0,99

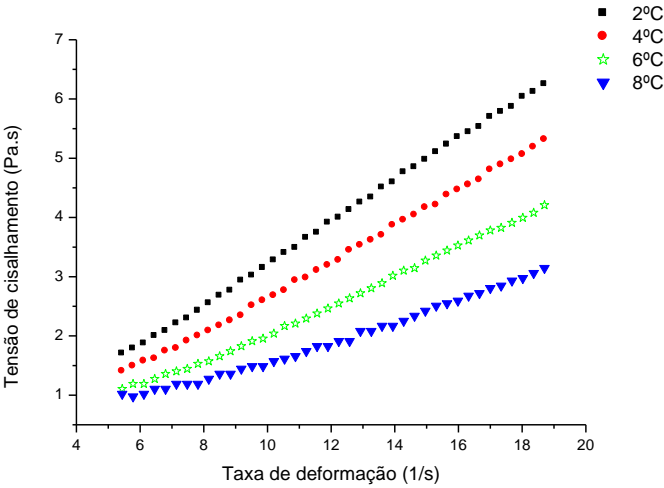


Figura 1. Reogramas de iogurte probiótico obtidos a partir da taxa de deformação e tensão de cisalhamento, curvas ascendentes.

CONCLUSÃO

O modelo da lei da Potência foi aplicado com sucesso para descrever as propriedades reológicas dos iogurtes probióticos elaborados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-JDAYIL, B.; MOHAMEED, H. Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time. *Journal of Food Engineering*, Essex, v. 52, n. 4, p. 359-365, 2002.

AWADHWAL, N. K.; SINGH, C. P. A rheological model for Milk products. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 50, n.6, p. 1611-1614, 1985.

BRASIL, Portaria 71. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. *Diário Oficial da União* de 21/09/2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução no 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializa os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de leites fermentados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 27 novembro 2000, sec. 1, p. 9.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.12, n. 1, p. 23-33, 2009.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, v.6, n.7, p.241-245, 1995.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. *Biotechnology Advances*, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

STEFEE, J. F. *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing Press, 1996.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobactérias and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 271-275, 2000.